

北九州市立大学 国際環境工学研究科

博 士 論 文

論 文 題 目

低分子代謝物の分子情報： 疾患相関の解明およびその検知

〔 Chemical information of low molecular weight metabolites:
Elucidation of disease correlation and sensor approaches for detection 〕

王 涛

環境システム専攻 環境化学プロセスコース

研究指導教員 李 丞祐

平成 29 年 3 月

著作権者

王 涛

2017 年 3 月

© Copyright 2017 by Tao Wang

All rights reserved.

博士論文タイトル：

低分子代謝物の分子情報：疾患相関の解明およびその検知

Chemical information of low molecular weight metabolites:

Elucidation of disease correlation and sensor approaches for detection

著者：王 涛

審査長：李 丞祐（教授）

審査員：秋葉 勇（教授）

審査員：中澤 浩二（教授）

審査員：高橋 徹（教授）

目次

表紙	I
著者権	II
審査員	III
目次	IV
表のリスト	VIII
図のリスト	IX
論文概要	XVII
謝辞	XXIV

第1章研究目的および背景	1
1.1 低分子代謝物によるがんの早期発見	2
1.2 揮発性低分子代謝物の識別	7
1.3 固相マイクロ抽出法(SPME)による揮発性低分子分析	11
1.3.1 固相マイクロ抽出法(SPME)とは	11
1.3.2 ダイレクト抽出法	17
1.3.3 抽出方式の最適化—薄膜抽出法	20
1.3.4 抽出材料の最適化—多孔質材料の導入	22
1.4 本研究の目的	33
 第2章効率的な VOC 抽出方法の検討および生体 VOC 分析に必要な基盤技術の確立	 35
2.1 緒言	36
2.2 実験項目	37
2.2.1 使用試薬	37
2.2.2 ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜の作製	38
2.2.3 ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の特性評価	38
2.2.4 サンプリングと分析	39
2.2.5 GC-MS 測定条件	40
2.3 結果および考察	41
2.3.1 ZSM-5/PDMS 薄膜の特性評価	41
2.3.2 VOC 抽出の感度に対する PDMS 中のゼオライト含量の影響	43
2.3.3 抽出条件と脱離条件の最適化	45
2.3.4 水性サンプル中の VOC 抽出に及ぼすゼオライトの影響	48
2.3.5 水中 VOC 分析における ZSM-5/PDMS 薄膜の抽出特性評価	49
2.3.6 実サンプルへの応用	52

2.4 結論	53
2.5 補足資料	55
第3章 唾液・尿中 VOC に基づいたヒト代謝情報の解析	61
3.1 緒言	62
3.2 実験項目	64
3.2.1 使用試薬	64
3.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製	64
3.2.3 唾液および尿のサンプリング	65
3.2.4 肺癌および肺正常細胞の連続培養	66
3.2.5 GC-MS 測定条件	67
3.3 結果および考察	68
3.3.1 ヒトの唾液および尿中 VOC 情報	68
3.3.2 ヒトの唾液および尿中 VOCs の出現頻度	72
3.3.3 ヒトの唾液および尿中 VOC 含有量の比較	76
3.3.4 官能基によるヒト唾液および尿中 VOCs の分類	78
3.3.5 ヒト唾液および尿から検出した VOCs の PCA 解析	80
3.3.6 がん患者唾液中 VOC 分析および健常者との比較	82
3.3.7 連続的なヒト尿中 VOCs の分析	89
3.3.8 ヒト肺がん細胞およびヒト肺細胞の揮発性代謝物とヒト尿中代謝物との相関	95
3.4 結論	104
第4章 生体 VOC と疾患相関の解明:ヒト子宮頸がん細胞株(HeLa)培養における VOC	106
バイオマーカーの探索	
4.1 緒言	107
4.2 実験項目	110
4.2.1 使用試薬	110
4.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製	110
4.2.3 HeLa 細胞培養	111
4.2.4 サンプリングと分析	112
4.2.5 GC-MS 測定条件	113
4.3 結果と考察	114
4.3.1 GC-MS 分析による細胞培地中の VOCs の分析	114
4.3.2 世代間での揮発性低分子代謝物の再現性	120
4.3.3 HeLa 細胞培養における VOC 代謝パターン	122
4.3.4 細胞培養液中 VOC 分析におけるゼオライト効果	126

4.3.5 薬品の添加による細胞活動への影響	128
4.4 結論	135
第 5 章生体 VOC と疾患関連の解明:ヒト肝癌細胞株(HepG2)における揮発性低分子バイオマーカーの探索	136
第 1 節 HepG2 における揮発性低分子バイオマーカーの探索	137
5.1.1 緒言	137
5.1.2 実験項目	139
5.1.2.1 使用試薬	139
5.1.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製	140
5.1.2.3 HepG2 細胞培養	140
5.1.2.4 細胞の計数	142
5.1.2.5 試料のサンプリング	143
5.1.2.6 GC-MS 測定条件	144
5.1.3 結果および考察	144
5.1.3.1 HepG2 細胞培養における揮発性低分子代謝物分析の結果	144
5.1.3.2 揮発性低分子代謝物の世代間変化の確認	149
5.1.3.3 PCA および HCA 解析	150
5.1.4 結論	151
第 2 節 HepG2 細胞培養から同定された揮発性バイオマーカーの HepG2 細胞の代謝への影響	152
5.2.1 緒言	152
5.2.2 実験操作	153
5.2.2.1 液相 VOC バイオマーカーの投与	153
5.2.2.2 VOC バイオマーカーのガス暴露	154
5.2.3 結果および考察	155
5.2.3.1 液相 VOC バイオマーカーの投与による HepG2 細胞数の変化	155
5.2.3.2 液相 VOC バイオマーカーの投与による HepG2 細胞 VOCs 代謝への影響	157
5.2.3.3 HepG2 細胞 VOC 代謝の PCA 解析	160
5.2.3.4 ガス状の 1-butanol の暴露による HepG2 細胞代謝変化	160
5.2.3.5 VOC バイオマーカーの蒸気暴露によるがん細胞の VOCs 代謝の変化	161
5.2.3.6 VOC 蒸気暴露による VOC 代謝変動の PCA 解析	164
5.2.3.7 高濃度の 1-butanol ガス暴露	165
5.2.3.8 VOC ガス暴露による HepG2 細胞活性への影響のメカニズム	166
5.2.4 結論	168
第3節HepG2細胞へのガンボク酸抗がん剤添加を利用した薬理メタボロームアプローチ	170

5.3.1 緒言	170
5.3.2 実験操作	171
5.3.2.1 抗がん剤の添加による HepG2 細胞の VOCs 代謝物の分析	171
5.3.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜ミニディスクによる抗がん剤の添加後の HepG2 細胞の VOCs 代謝物分析	171
5.3.3 実験結果および考察	173
5.3.3.1 抗がん剤の添加による HepG2 細胞の VOCs 代謝物の分析	173
5.3.3.2 ZSM-5/PDMS 薄膜のミニディスクによる抗がん剤の添加後の HepG2 細胞の VOC 代謝物分析	176
5.3.4 結論	181
第 6 章疾患における低分子代謝物検出方法の検討	183
6.1 序論	184
6.1.1 低分子代謝物の検出の重要性	184
6.1.2 アンモニア	186
6.1.3 ポリアミン	187
6.2 低分子代謝物の検出方法	188
6.2.1 光学センサーデバイス: 長周期格子(LPG)光ファイバー	188
6.2.2 交互積層膜によるセンサー表面修飾	193
6.3 低分子代謝物の検出	196
6.3.1 ポルフィリンの光吸収特性に基づいたアンモニアガス検知	196
6.3.2 高分子電解質薄膜の屈折率変化に基づいたアンモニアガス検知	207
6.3.3 分子インプリント法に基づいた LPG 光ファイバーセンサーの選択性向上	214
6.3.4 金ナノ粒子によるヒトポリアミン検知	225
6.3.5 AuNPs/高分子電解質膜を用いた光ガス検知	236
6.4 結論	244
第 7 章結論	246
参考文献	247

表リスト

Table 1.1. Classification of biomarkers based on purpose.

Table 1.2. Analytical methods of low molecular weight metabolites and their comparison.

Table 1.3. Selected applications of fiber SPME techniques in analysis.

Table 1.4. Comparison of zeolite/polymer composites for analytical purposes.

Table 2.1. LODs and LOQs for individual analytes obtained from the GC–MS analysis using 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

Table 2.S1. Physico-chemical characteristics of analytes used for this study.

Table 2.S2. VOCs identified from two soft drinks.

Table 3.1 VOCs extracted from saliva and urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Table 3.2 Classification based on *AF* of VOCs showing day reproducibility in saliva and urine.

Table 3.3 Personal information such as the cancer type, age, etc. of the cancer subjects.

Table 3.4. VOCs extracted from healthy subject and patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Table 3.5 Analysis of VOCs in urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Table 3.6 List of the VOCs obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

Table 3.7. List of the VOCs biomarkers obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

Table 4.1. The variation of VOCs by the HeLa cell culture.

Table 4.2. VOCs analysis by the HeLa cell culture using PDMS film extraction.

Table 4.3. Details of ingredients of pabron gold and results of ZSM-5/PDMS-TFME-GC-MS analysis.

Table 4.4. The variation of VOCs metabolism of HeLa cells by administration of pabron.

Table 5.1.1. The variation of VOCs by the HepG2 cell culture.

Table 5.2.1. Physico-chemical characteristics of analytes used for this chapter.

Table 5.2.2. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after exposure to 1-butanol gas (5 ppm in aqueous solution).

Table 5.3.1. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after cultured with different concentration of GA.

Table 5.3.2. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after cultured with different concentration of GA via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

図リスト

Figure 1.1. Estimated number of new cancer cases by word area 2012.

Figure 1.2. Estimated number of new cancer cases and number of cancer deaths by word area 2012[2].

Figure 1.3. Systems biology. Regulatory processes at the DNA level affect the expression of downstream molecules, including RNAs, proteins, and metabolites [7].

Figure 1.4. Numbers of OR genes in the genome sequence from 13 placental mammal species [14].

Figure 1.5. Mechanism of olfactory of living organisms [15].

Figure 1.6. Schematic diagram of SPME fiber [31].

Figure 1.7. Summary of the published SPME papers and the citations during the past decade [32].

Figure 1.8. SPME procedure for GC. Reprinted from *Journal of Chromatography A*, **880** [33].

Figure 1.9. SPME is a three phase system between aqueous solution, headspace and fiber coating.

Figure 1.10. Drawing of the headspace membrane SPME system. 1. Deactivated stainless steel rod. 2. Flat sheet membrane. 3. Sample solution. 4. Teflon-coated stirring bar. 5. Rolled membrane. 6. Injector nut. 7. Rolled membrane. 8. Glass liner. 9. Capillary column.

Figure 1.11. Summary of the published TFME papers during the past [42].

Figure 1.12. 3D scheme representing the gas diffusion mechanism in a PDMS membrane [43].

Figure 1.13. The Structure of the PDMS material after polymerization reaction.

Figure 1.14. Properties of commercially available SPME fibers. CW/TPR, carbowax/ templated resin; PEG, polyethylene glycol; PDMS, poly(dimethylsiloxane); DVB, divinylbenzene; PA, polyacrylate; CAR, carboxen and the analyte molecular weight range approximation.

Figure 1.15. Schematic representation of absorptive versus adsorptive extraction and adsorption in small versus large pores.

Figure 1.16. Classification of porous materials based on pore size and structure.

Figure 1.17. Crystal structures and specific surface area of different inorganic materials [99].

Figure 1.18. (a) The average percentage of surface atoms as a function of the nanoparticle diameter. Reprinted with permission from ref. 52. (b) A structural scheme for a typical activated carbon, which contains highly disordered macropores (>50 nm), mesopores (2–50 nm) and micropores (<2 nm). The micropores contribute to a large part of its surface area, but are only available for the adsorption of small molecules and may be easily jammed by large molecules [100].

Figure 1.19. Research schematic of this PhD thesis.

Figure 2.1. Schematic illustration of GC–MS analysis of organic volatiles via ZSM-5/PDMS hybrid-film extraction.

Figure 2.2. SEM surface images of (a) a PDMS film, and (b) 10 wt% and (c) 20 wt% ZSM-5/PDMS

hybrid films. (d) SEM cross-sectional view of c.

Figure 2.3. AFM images of (a, b) a PDMS film, and (c, d) 10 wt% and (e, f) 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

Figure 2.4. (a) Relationship between the peak areas of the selected three analytes and the zeolite contents in the films. Influence of (b) extraction temperatures, (c) release temperatures and (d) release time of the selected three analytes on the 20 wt% ZSM-5/PDMS thin film extraction. (e) PCA plots comparing extraction efficiency of all VOCs under different extraction and release conditions. Extraction conditions: sample volume 50 mL, concentration 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 ppm) for each compound, incubation time 3 h, (a) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release continuously agitated at 200 rpm for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$, (b) release: continuously agitated at 200 rpm for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$, (c) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release: left standing for 30 min and (d) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release: left standing at 30 $^{\circ}\text{C}$.

Figure 2.5. Comparison of extraction efficiencies of the PDMS (0.5 g), 20 wt% SAPO-34/PDMS (0.5 g), 20 wt% ZSM-5/PDMS (0.5 g), and 20 wt% ZSM-5/PDMS (1.0 g) films with peak areas of analytes.

Figure 2.6. Comparison of the extraction efficiencies of the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film and the commercial 65 μm PDMS/DVB SPME fiber. The concentration of each analyte is 1.0 ng/mL (1.0 ppb). TFME sampling conditions ($n = 3$): sample volume 50 mL, temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, incubation time 3 h, release temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, and release time 30 min. SPME sampling conditions ($n = 3$): sample volume 50 mL, room temperature, incubation time 3 h.

Figure 2.S1. Total ion chromatograms of the as-prepared hybrid film with a with 20 wt% ZSM-5 content. Signals with high peak intensities in the mass spectra are attributable to contamination by siloxane bleed (m/z 73, 207), which significantly decrease after methanol rinsing for: (1) 1 day, (2) 2 days, and (3) 3 days.

Figure 2.S2. Reconstructed chromatograms for 1-pentanol, 1-octanol, and benzyl alcohol extracted from the (1) PDMS film, and the (2) 10 wt% and (3) 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

Figure 2.S3. (a) Comparison of extraction efficiencies of the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film with peak areas of analytes under different extraction temperature conditions. (b) Reconstructed chromatograms for 1-octanol and benzyl alcohol extracted from the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film under different release temperature conditions; (1) 30 $^{\circ}\text{C}$, (2) 20 $^{\circ}\text{C}$ and 10 $^{\circ}\text{C}$.

Figure 2.S4. Calibration curves of twelve standard compounds.

Figure 2.S5. Comparison of the peak areas of twelve analytes: (■) extracted from a 50 mL standard aqueous solution (1.0 ppm each component) using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film and (■) dissolved in methanol (1.0 ppm each component).

Figure 2.S6. Typical total ion chromatograms of VOCs contained in two soft drinks.

Figure 3.1. Schematic illustration of GC–MS analysis of organic volatiles via ZSM-5/PDMS hybrid-film extraction.

Figure 3.2. Typical TICs Typical of VOCs contained in both saliva (a) and urine (b) samples collected from the same subject on the same day.

Figure 3.3. Comparison of average peak areas showing 6 VOCs ($FA \geq 0.7$) present in saliva and urine after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.4. The relative peak area of compounds in each class that have been detected in human (a) saliva and (b) urine.

Figure 3.5. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from saliva and urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.6. Comparison of average peak areas showing VOCs present in patient and healthy subject saliva after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.7. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.8. VOCs extracted from patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.9. Daily variability of VOCs in human urine.

Figure 3.10. Comparison of peak areas present in urine of subject A, B and group (C) after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.11. Comparison of peak areas present in urine of subject A, B and group (C) after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.12. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.13. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid bottle film extraction.

Figure 3.14. PCA analysis of VOCs metabolic components of (a) A549 and OUS-11 cell lines and (b) A549, OUS-11 cell lines and DMEM via ZSM-5/PDMS composite thin film.

Figure 4.1. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via ZSM-5/PDMS composite thin film.

Figure 4.2. Real time images of HeLa cell in culture on dish. Brightness and contrast of the all images were corrected.

Figure 4.3. Real time images of HeLa cell in culture on the dish (a), and peeled off from the dish in the glass plate for viewing by optical microscope (b), (c). Brightness and contrast of the all images were corrected.

Figure 4.4. Comparison of VOCs chromatograms from the medium with cell cultured (No. 1), free

medium (No. 2) and Methanol blank (No. 3).

Figure 4.5. Peak area of VOCs that the p-value were less than 0.05 in HeLa cell culture.

Figure 4.6. VOCs tended to increase which showed good intra-generational and inter-generational reproducibility.

Figure 4.7. VOCs tended to decrease which showed good intra-generational and inter-generational reproducibility.

Figure 4.8. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA (a) Score plot, (b) loading plot.

Figure 4.9. Classification of VOCs involved in HeLa cell culture.

Figure 4.10. Analysis of VOCs involved in HeLa cell culture by hierarchical cluster analysis.

Figure 4.11. Comparison of the PDMS single film and the ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 4.12. Real time images of HeLa cell in culture with 1 ppm of pabron on dish (a) straight after HeLa cell seeding and (b) after 96 hours cultured.

Figure 4.13. Confirmation of number of HeLa cell culture under normal culture condition and pabron administration culture condition and inter-generational reproducibility.

Figure 4.14. Comparison of peak area of VOCs detected from HeLa cell culture under normal and pabron administration conditions.

Figure 4.15. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA (a) cultivation results under different conditions and (b) comparison of two cell cultures samples and two DMEM medium control.

Figure 5.1.1. Schematic diagram of human liver.

Figure 5.1.2. Peak area of VOCs that the p-value were less than 0.05 in HepG2 cell culture.

Figure 5.1.3. Peak area of VOCs detected in HepG2 cell culture.

Figure 5.1.4. Peak area of 8 VOCs which showed significant increase or decrease.

Figure 5.1.5. Analysis of VOCs components involved in HepG2 cell metabolism by PCA (a) score plot and (b) loading plot.

Figure 5.1.6. Analysis of VOCs involved in HeLa cell culture by hierarchical cluster analysis.

Figure 5.2.1. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via ZSM-5/PDMS composite thin film.

Figure 5.2.2. Schedule of HepG2 and HeLa, A549 cells culture and GC-MS analysis.

Figure 5.2.3. Effect of HepG2 cell activity by administration of VOCs (1-butanol, cyclohexanol and benzyldehyde) in liquid phase.

Figure 5.2.4. Changes in VOCs metabolism of HepG2 cell by addition of 1-butanol.

Figure 5.2.5. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA score plot.

Figure 5.2.6. Relative cell number of HepG2 and HeLa, A549 cells after exposure to 1-butanol (5

ppm in aqueous solution).

Figure 5.2.7. Peak area comparison of VOCs metabolic components of HepG2 cell line (red) before and (blue) after exposure to 1-butanol (5 ppm in aqueous solution) gas via ZSM-5/PDMS composite thin film.

Figure 5.2.8. PCA analysis of VOCs metabolic components of (a) HepG2 cell line and (b) HepG2, HeLa, A549 cell lines before and after exposure to 1-butanol (5 ppm in aqueous solution) gas via ZSM-5/PDMS composite thin film extraction. (Hela and A549 cell normal n = 3 and exposure n = 3, HepG2 cell line normal n = 18 and exposure n = 18).

Figure 5.2.9. (a) Relative cell number of HepG2 and HeLa, A549 cell lines after exposure to 1-butanol (50 ppm in aqueous solution). (b) Peak areas of 1-butanol recovered from the cell culture medium under 1-butanol gas exposure and normal culture condition during the continuous culture period of six generations.

Figure 5.2.10. Mechanism of dynamic equilibrium of low molecular metabolites in cancer cells.

Figure 5.3.1. Structural formula of gambogic acid (GA) and when GA was adjusted with (red) DMEM medium and (yellow) DMSO solvent.

Figure 5.3.2. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via (a) ZSM-5/PDMS composite bottle film and (b) ZSM-5/PDMS composite mini disk.

Figure 5.3.3. Stereomicroscope images of HepG2 cells cultured with (a,f) 0 and (b,g) 0.1, (c,h) 0.25, (d,i) 0.5, (e,j) 0.75 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 5.3.4. HepG2 cell number after cultured with different concentration of GA.

Figure 5.3.5. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that were increased or decreased.

Figure 5.3.6. HepG2 cell number after cultured with different concentration of GA via ZSM-5/PDMS mini disk extraction and bottle film extraction.

Figure 5.3.7. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that showed concentration dependence via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

Figure 5.3.8. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that showed concentration dependence via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

Figure 6.1. Chemical structures of the compounds used for film preparation and schematic illustration of an LPG fiber.

Figure 6.2. The relationship between the grating period and the wavelength at which coupling occurs to a set of symmetric cladding modes ($\text{LP}_{0,20}$ – $\text{LP}_{0,25}$), where numbers refer to the order of the cladding mode, LP_{0x} , assuming that the LPG was fabricated in an optical fiber of a cut off wavelength of 670 nm.

Figure 6.3. (a) Transmission spectra of the LPG (100 μm) in Sucrose solutions of different concentrations. (b) Dependence of the wavelength shift upon the Sucrose concentrations. RI data of Sucrose solutions are taken from the reference.

Figure 6.4. Transmission spectra of the LPG (110.8, 110.9, 111.1, 111.3 μm) in Sucrose solutions of different concentrations. Dependence of the wavelength shift upon the Sucrose concentrations. RI data of Sucrose solutions are taken from the reference.

Figure 6.5. Schematic diagram of Layer-by-Layer method.

Figure 6.6. Schematic of the deposition of a film containing PDDA and TSPP onto an LPG optical fiber.

Figure 6.7. Changes in the transmission spectra of the LPG optical fiber as the number of layers deposited (marked next to each line) increased, when the outermost layer was (a) PDDA and (b) TSPP.

Figure 6.8. UV–vis absorption spectra of a PDDA/TSPP alternate film produced using five deposition cycles when the outermost layer was (a) PDDA and (b) TSPP. The insert in (b) shows the relationships between the absorbances at 429, 485, and 700 nm and the number of deposition cycles performed.

Figure 6.9. UV–vis absorption spectra of a PDDA/TSPP film deposited using five cycles before and after the film was exposed to HCl vapor produced by a 0.1 M HCl solution, and transmission spectra of a PDDA/TSPP film deposited using fifteen cycles before and after the film was exposed to HCl vapor produced by a 0.1 M HCl solution.

Figure 6.10. (a) Changes in the transmission spectra and (b) responses of the sensor when the LPG sensor coated with a PDDA/TSPP film produced using fifteen deposition cycles was exposed to ammonia gas, where 0 ppm means pure water vapor (containing no ammonia).

Figure 6.11. Comparison of the wavelength shifts after exposed to 100 ppm ammonia and the transmission changes obtained using the sensors with films produced using six, nine, and fifteen deposition cycles.

Figure 6.12. (a) Evolution of the UV–vis absorption spectrum of a PDDA/TSPP film produced using five deposition cycles on a quartz plate. The black line is for the as-prepared film, the green line for the film after it had been exposed to HCl vapor produced by a 1.0 M HCl solution, and the blue line is for the film after it had been exposed to ca. 500 ppm ammonia gas. (b) Schematic of the mechanism through which the PDDA/TSPP film deposited on an LPG fiber senses ammonia.

Figure 6.13. Chemical structures of the compounds used for film preparation and schematic illustration of an LPG fiber.

Figure 6.14. TS changes of the LPG optical fibre after deposition of PAA: (a) PAH/PAA and (b) PDDA/PAA films, respectively.

Figure 6.15. (a) TS changes of the LPG fibre modified with a 7-cycle PAH/PAA film at the exposure

to different concentrations of ammonia gas and (b) dependence of wavelength shifts and TS changes of the 2nd resonance band upon the ammonia gas concentration.

Figure 6.16. (a) Reflection spectra of the films with different PAA deposition layers and (b) film thicknesses calculated from the reflection spectra. (c) Reflection spectra of the 7-cycle PAH/PAA film after exposure to different concentrations of ammonia gas and (d) the corresponding OT changes.

Figure 6.17. AFM images of the surface morphology of the 7-cycle (a and b) PDDA/PAA and (c and d) PAH/PAA films before (a and c) and after (b and d) exposure to ammonia gas (3000 ppm), respectively.

Figure 6.18. (a) Thickness changes of the PAH/PAA and (PAH/PAA)₁PAH films after exposure to ammonia gas (3000 ppm). Schematic illustration explains the mechanism of the morphological changes of both films.

Figure 6.19. Schematic illustration of the morphology change in the PAH/PAA film after exposure to ammonia gas.

Figure 6.20. Chemical structures and abbreviations of the compounds used for molecular imprinting and photodegradation experiments.

Figure 6.21. Schematic illustration of the process of modifying the surface of the optical fiber LPG with a molecularly imprinted film.

Figure 6.22. TS of the LPG optical fiber upon deposition of the (a) TMPyP/TiO₂ film and (b) NI-film for 4.5 h, and after heat-treatment at 60 °C (humidity 90 %) for 12 h, measured in water and air.

Figure 6.23. Comparison of the SEM images of the films deposited on silicon wafers. (a) NI-film after 4.5 h deposition and (b) after 12 h heat treatment at 60 °C. (c) TMPyP/TiO₂ film after 4.5 h deposition and (d) after 12 h heat treatment at 60 °C; The insets in (b) and (d) show photographs of the NI-film and TMPyP/TiO₂ film prepared on the silicon substrate, respectively.

Figure 6.24. TS of the MI-film-modified LPG upon rebinding with different concentrations of TMPyP in (a) water and (b) air. (c) Calibration curves plotted from wavelength shifts of the 1st and 2nd resonance bands in water, and the 2nd resonance band in air.

Figure 6.25. Comparison of the wavelength shifts upon exposure to the template and guest molecules for the MI- and NI-films.

Figure 6.26. (a) UV-vis absorption spectra of the MI-film before and after heat treatment at 60 and 90 °C and upon TMPyP removal and rebinding in a 100 μM solution. The pink line shows the UV-vis spectrum of a TMPyP solution (10 μM). (b) The photodegradation of TMPyP on the MI-films, which are prepared without heat treatment (black line), with heat treatment at 60 °C (red line), and with heat treatment at 90 °C (blue line), under UV irradiation assessed from the absorbance at 422 nm.

Figure 6.27. TS of the MI-film-modified LPG sensor prepared to explore its photocatalytic activity

and (b) dynamic intensity changes of the MI-film-modified LPG sensor due to TMPyP rebinding measured at 800 nm under indoor visible light and under UV irradiation.

Figure 6.28. Schematic diagram of photocatalytic function of titanium oxide thin film.

Figure 6.29. Structures of the chemicals used in this study.

Figure 6.30. (a) UV-vis spectra of c-AuNPs in aqueous solutions of SPM at different concentrations and (b) dynamic responses obtained from the formula of A_{520+1}/A_{700+1} .

Figure 6.31. (a) Visual color changes of c-AuNPs in aqueous solutions of SPM at different concentrations (from 0 to 50 μM). (b) TEM image of aggregated c-AuNPs in a SPM solution at 2.5 μM .

Figure 6.32. pH of SPM solutions at different concentrations with (\circ) and without (\square) c-AuNPs.

Figure 6.33. Calibration curves of A_{520+1}/A_{700+1} vs. concentrations of amine compounds including c-AuNPs. Inset shows a linear dependence of A_{520+1}/A_{700+1} on the DAH concentration.

Figure 6.34. (a) UV-vis spectra changes of c-AuNPs due to addition of a different volume of SPM at 5 μM in water and (b) absorbance changes at 520 and 700 nm.

Figure 6.35. UV-vis spectra of c-AuNPs with (a) a diameter of 5 nm and (b) a 1:1 mixture of 5 and 20 nm in diameter in an aqueous solution of SPM at 2.5 μM .

Figure 6.36. UV-vis spectra of c-AuNPs with a diameter of 20 nm (solid line in all figures) when diluted with (a) water and urine samples from three healthy volunteers: (b) A, (c) B, and (d) C with (dotted lines) and without (dashed lines) 2.5 μM SPM, respectively.

Figure 6.37. UV-vis spectra of c-AuNPs in aqueous solutions of amino acids at 500 μM .

Figure 6.38. Schematic illustration of synthesis of cationic gold nanoparticles (AuNPs^+).

Figure 6.39. (a) UV-vis spectrum of AuNPs^+ (0.5 mg mL^{-1} in water) and (b) TME image of AuNPs^+ . Inset of (a) shows the size distribution diagram of AuNPs^+ .

Figure 6.40. UV-vis spectral changes during the 10-cycle film deposition of AuNPs^+ with an alternate layer of (a) PAA and (b) PSS on quartz substrates. Insets show absorbance increases at 229 and 544 nm.

Figure 6.41. (a, c) UV-vis spectra measured after the film was exposed to the ammonia gas vaporized from a solution of 1 wt% ammonia for 30 min and immersed in a solution of HCl in water (0.1 M) for 15 min for the 10-cycle AuNPs^+ /PAA and AuNPs^+ /PSS films, respectively. (b, d) Shifts of SPR absorption maximum and absorbance changes at 299 and 544 nm for each film.

Figure 6.42. Comparison of FTIR spectra of (a) **1** and a 10-cycle AuNPs^+ /PAA film on a gold-coated glass substrate (b) before and (c) after exposure to ammonia gas and (d) after HCl treatment. Adopted wavenumbers: (i) 3296, (ii) 2917, (iii) 2850, (iv) 1720, (v) 1639, (vi) 1544, (vii) 1453, and (viii) 1414 cm^{-1} .

Figure 6.43. Schematic illustration of the correlation between the optical and morphological changes in the AuNPs^+ /PAA film due to exposure to ammonia gas and HCl treatment.

論文概要：

がんは、主要な死因の一つであり、がんの早期発見ができれば、がん患者の生存率が高まることが期待されている。がんの早期発見には、新たな非侵襲的な診断法や検査法が必要とされている。ゲノミクス、プロテオミクス、バイオインフォマティクス、そして近年話題となったメタボロミクス等のバイオマーカーは、がんなどの疾患の原因と遺伝的変動との相互作用と相互関係を理解するのに役に立つ。特に、近年では、尿およびプラズマなどの体液中の低分子代謝物(分子量が 1 kDa 以下)を様々な分光法を用いて分析し、更に、定量化することができ、代謝表現型の情報を提供し、個別化医療や公共医療に適用することができる。しかし、日常検査に適応可能な高感度と特異度に優れたがんバイオマーカーが少なく、新規がんバイオマーカーの発見が急務となっている。近年、揮発性有機化合物(VOCs)は、がんなどの疾患のバイオマーカーであると認識され、低分子揮発性バイオマーカーの分析は、最も有望なメタボロミクスアプローチの一つである。そこで本研究は、生体試料(主に唾液と尿)並びにがん細胞培養において代謝する VOCs の中からがんバイオマーカーの特定を行い、非侵襲的かつ確実性の高いがんの早期発見方法の樹立を目指す。

本博士論文は、**全 7 章**から構成されている。

第 1 章では、研究背景や目的、論文の構成を記述した。

第 2 章では、水溶液中の VOCs を高感度に抽出できる ZSM-5(ゼオライト)/PDMS(ジメチルポリシロキサン)ハイブリッド薄膜を開発し、ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC-MS)による VOCs の同定を記述した。その結果、ZSM-5/PDMS 薄膜は、水溶液中の多様な VOCs への抽出率の向上を実現した。

第 3 章では、ZSM-5/PDMS 薄膜による高感度なヒト唾液および尿中 VOCs の分析結果を記述した。バイオマーカーは、ヒトの血液から探索するのが最も効率的であるが、血液の採取が侵襲的であり、血漿や血清のプロテオーム解析(微量タンパク質の解析)

が容易ではない。血液中の VOCs は、一般的に受動拡散を介し、唾液に転送される。そのため、唾液中の VOCs は、血液中の生化学的情報を反映する。従って、唾液分析は、人体生理学および病理学的状態を調べるための有効な方法であると考えられる。本章では、健常者 8 名の唾液と 6 名の尿の分析から、良好な日間再現性を示した 34 と 33 成分の VOCs がそれぞれ特定できた。人体における VOCs の分子情報の解明や成分の内因性・外因性の区別を可能にした。また、口腔がん患者唾液に含まれる VOC 分析を行い、健常者と区別することができ、がんを識別できる複数のバイオマーカーが得られた。

第 4 章では、開発した ZSM-5/PDMS 薄膜を利用し、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん)培養における揮発性低分子バイオマーカーの探索を述べた。結果として、有意差を示した VOCs は、14 成分であった。本章は、少量の細胞培養液(6 mL)に存在する微量な VOCs の高感度な抽出および分析を行った。連続的に培養した細胞の分析を通じて新規確実性が高い揮発性バイオマーカーの特定に成功している。更に、薬品の HeLa 細胞培養への投与による細胞 VOC 代謝の影響を発見した。

第 5 章では、HepG2 細胞(ヒト肝がん)を培養し、VOC バイオマーカーの解明を試みた。ヒト肝臓由来の分化細胞株の HepG2 は、ウイルス感染がないため、肝細胞がんモデルとして使用できる純粋な細胞株である。結果として、7 成分が有意差を示し、潜在的な HepG2 細胞の VOC バイオマーカーである。また、HepG2 細胞を潜在的な VOC バイオマーカーである 1-butanol ガスに暴露したところ、HepG2 細胞の死滅が誘導され、通常培養条件と異なる VOCs の代謝パターンが示された。本研究で発見した新規 VOC バイオマーカーの抗がん性を実証した。

第 6 章では、これまでに得られた疾患と関連する低分子代謝物の分子情報を背景に、新たな低分子代謝物の検出方法の開発を行った。長周期格子光ファイバー(LPG)は、ファイバーコア屈折率の周期的な変調であり、ファイバー周囲の屈折率を敏感に

捉えることができる。このような物理パラメーターである屈折率を高感度に応答する光ファイバーに高分子電解質、シリカナノ粒子、ポルフィリン、酸化チタンなどのナノ薄膜(人工レセプター)を修飾することで、LPG は、高感度かつ選択的な低分子代謝物のセンサーとして応用できることを証明した。また、高い吸光係数、大きい表面積、ユニークな表面プラズモン共鳴(SPR)などの特徴を有する金ナノ粒子(AuNPs)を利用し、アンモニアガスやヒト尿中腫瘍バイオマーカーであるスぺルミン(ポリアミン)の検出を可能にした。将来的に、新しい疾患診断技術の確立を目指す。

第7章では、各章で得られた知見を整理し、総括とした。

Abstract:

Cancer is one of the major causes of death in the world. It is expected that survival rate will increase if early detection of cancer is possible. Therefore, noninvasive diagnostic and specific testing methods for the early detection of different types of cancer is required. Genomics, proteomics, bioinformatics, and in recent years metabolomics which became a hot topic, is helps to understand the interaction and the mutual relationship between the genetic variation and the pathogenesis of the disease. In particular, recently, metabolites (molecular weight ≤ 1 kDa) in body fluids such as urine and plasma can be quantitative and qualitative using various spectroscopic methods, therefore, analysis of metabolites provides information metabolic phenotype and it can be applied to individualized medicine and public health. However, there are few cancer biomarkers with high sensitivity and specificity that can be applied to routine examination, and discovery of novel cancer biomarkers is an urgent matter. In recent years, volatile organic compounds (VOCs) are being recognized as biomarkers for diseases such as cancer. Analysis of VOCs is one of the most promising metabolomics approaches, which could potentially serve as a reliable, noninvasive and specific test for the early detection of different types of cancer. In this thesis, analysis of cancer biomarkers from VOCs generated cancer cell culture and body fluids (saliva and urine) was investigated and a new noninvasive and high reliability diagnostic method for the early detection of cancer was established.

This thesis consists of **seven chapters**.

Chapter 1, scribes the research background, purpose and the composition of the thesis.

Chapter 2, ZSM-5 zeolite-loaded poly(dimethylsiloxane) (PDMS) hybrid thin films were demonstrated for efficient thin-film microextraction (TFME) coupled with gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) for analyzing organic volatiles in water.

The extraction efficiency for a series of aliphatic volatile compounds and two aromatic compounds was significantly improved owing to the presence of ZSM-5 zeolites. Limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of individual analytes were in the range from 0.0054 to 0.99 ppb and from 0.016 to 3.0 ppb, respectively. TFME procedure using the ZSM-5/PDMS hybrid film GC–MS method for VOCs extraction include sample volume reduction, high sensitivity, high resistance to the sampling environment, high extraction efficiency, and large extraction volume. This approach has a high potential to be easily applied to other research fields such as food and environmental analysis, and biotechnology.

Chapter 3, in this chapter established techniques for the analysis of VOCs in human saliva and urine with high sensitive. Biomarkers is most efficiently searched from human blood. However, blood sampling is invasive and proteome analysis (analysis of trace protein) of plasma and serum is not easy. VOCs in the blood is generally transferred to saliva via passive diffusion. VOCs in saliva reflects biochemical information in blood. The saliva and urine samples were continuously collected from eight and six healthy volunteers over a period of more than five days, respectively. Approximately 50 to 100 VOCs were obtained from the individual samples, among which 34 and 33 compounds were reproducible for the saliva and urine samples, respectively. The current study based on TFME using ZSM-5/PDMS hybrid films would provide a potential methodology for the sensitive analysis of VOCs or new biomarkers present at trace levels in biological samples. In addition, saliva of oral cancer patients was analyzed to enable identification of VOC-based cancer biomarkers. In the future it is expected to discover new VOC biomarkers showing high disease through analysis of saliva or urine of patients.

Chapter 4, VOCs analysis in cell culture is an excellent model for biological

mechanism research involving diseases such as cancer and is useful for defining potential VOCs biomarkers of disease. The VOCs associated with HeLa (cervical cancer) cell line metabolism have been analyzed with GC-MS by comparing culture medium without cell culture. 14 VOCs showed significant difference (wilcoxon signed-rank test, $p < 0.05$) for HeLa cells. In this chapter, sensitivity analysis of VOCs present in a small amount of cell culture medium (6 mL) was performed. Through analysis of continuously cultured cells, the present method succeeded in identifying volatile biomarkers with high certainty. In addition, the specific reduction of cancer cells was confirmed by adding potential VOCs base biomarker and conventional anti-cancer agents to cell culture. The influence of the cellular VOCs metabolism by drug administration to HeLa cell culture was discovered.

Chapter 5, discovery of novel cancer biomarkers of HepG2 cells (human liver cancer) was performed. HepG2 represents a pure cell line of human liver cancer with the benefit of no virus infection. As a result, 7 VOCs showed a revealed significant difference, which are potential HepG2 VOCs biomarkers. Exposure of HepG2 cells to the potential VOCs biomarker 1-butanol gas induced death of HepG2 cells and showed a metabolic pattern of VOCs different from ordinary culture conditions. The anticancer properties of the novel VOCs biomarkers discovered in this study have been demonstrated.

Chapter 6, based on the molecular information of low molecular weight metabolites related to diseases obtained by past study, new sensing approach for detecting low molecular metabolites were developed. Long period grating (LPG) is a periodic modulation of the refractive index (RI) of the core of an optical fiber. In this chapter, LPG for chemical and biomedical applications has been demonstrated. The combination of LPG optical fibers and nanomaterials thin film, such as polymer electrolyte, silica nanoparticles, porphyrin and titanium oxide etc, provided a prospect for the fabrication

of high sensitivity sensors offering specific binding to targeted chemical species. Gold nanoparticles (AuNPs) have features such as high extinction coefficient, large surface area, easy surface modification and unique surface plasmon resonance (SPR), etc. AuNPs can be applied as modifying materials for biosensor devices, and detection of biomarkers such as VOCs. This chapter demonstrated a new approach for selective and sensitive detection of VOCs based kidney disease marker (ammonia) and tumor biomarkers (spermine) sensing using AuNPs.

Chapter 7, the findings obtained in each chapter are organized and summarized.

謝辞

本博士論文の完成、博士学位取得あたり、終始適切な助言を賜り、また丁寧にご指導下さった李丞祐教授に心から感謝致します。いつも親身になって日夜研究に励む姿を拝見させて頂き、学生としてではなく研究者としての在り方を学ばせて頂きました。その貴重な経験を忘れず立派な人間になります。これからも色々ご迷惑をおかけすることがあるかと思いますが、どうか宜しくお願い申し上げます。

いつも丁寧に実験方法から考察に至るまでご指導を下さり、熱心に助言を賜った Stephen james 先生 (クランフィールド大学、Cranfield University)、Sergiy korposh 先生 (ノッティンガム大学、University of Nottingham)、安細敏弘先生 (九州歯科大学) に心から感謝致します。

李研究室の皆様、既に卒業された方々、在学中の方々また訪問に来て下さったレオーさん、ウリセスさん、九州歯科大学の茂山さん、北九州市立大学の教職員方など多くの方々に支えていただき、心から感謝致します。今後、皆様の更なるご活躍を心からお祈りします。

留学生活の全てをいつも暖かく支えて下さった両親そして家族の皆さんに心から感謝致します。これから真面目に働いて、少しでも親孝行ができたらと思っています。最後に、生涯勉強という言葉のを忘れずに、いつまでも謙虚な心を持ち、人生を歩んで行きたいです。

第 1 章

研究目的および背景

1.1 低分子代謝物によるがんの早期発見

がん(悪性新生物)は、世界で死亡原因の第 2 位である。2008 年に、世界範囲でがんによる死亡数が約 760 万人(全体の約 13%)であり、更に約 1240 万人が新たなにがんになったと推定されている。2012 年に、新たに約 1410 万人は、がんになり、がんによる死亡数は、820 万人であり、7 人中 1 人が死亡したことがわかる。その内訳は、先進国と発展途上国は、それぞれ、約 290 と 530 万人であった。2030 年に、がんによる死亡者数は、1310 万人以上に増加し、更に 2170 万人ががんを新たに患うと予測されている[1,2] (**Figure 1.1, 1.2**)。一方で、厚生労働省の調査によると日本国内において、近年、毎年 30 万人以上ががんによって死亡する。日本では、1981 年から死因第 1 位ががんであり、2 人に 1 人ががんを経験し、3 人に 1 人ががんで死亡する推移である。2011 年のがんの医療費は、年間 3.6 兆円にも上り、がんによる経済的、社会的損失は大きい。がんが難病になるまた転移する前に、早期診断と適切な治療が重要である[3]。

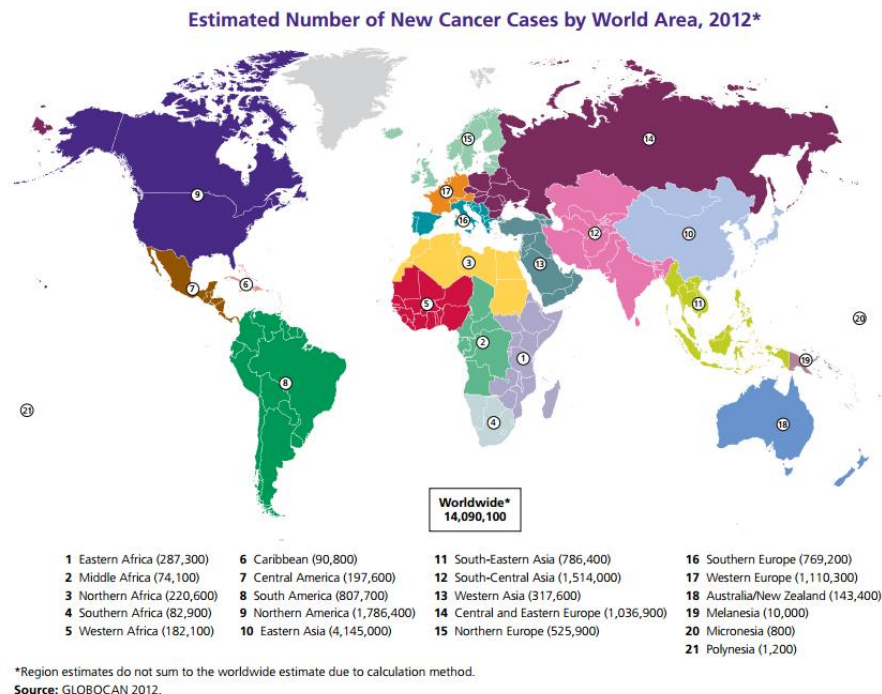


Figure 1.1. Estimated number of new cancer cases by word area 2012.

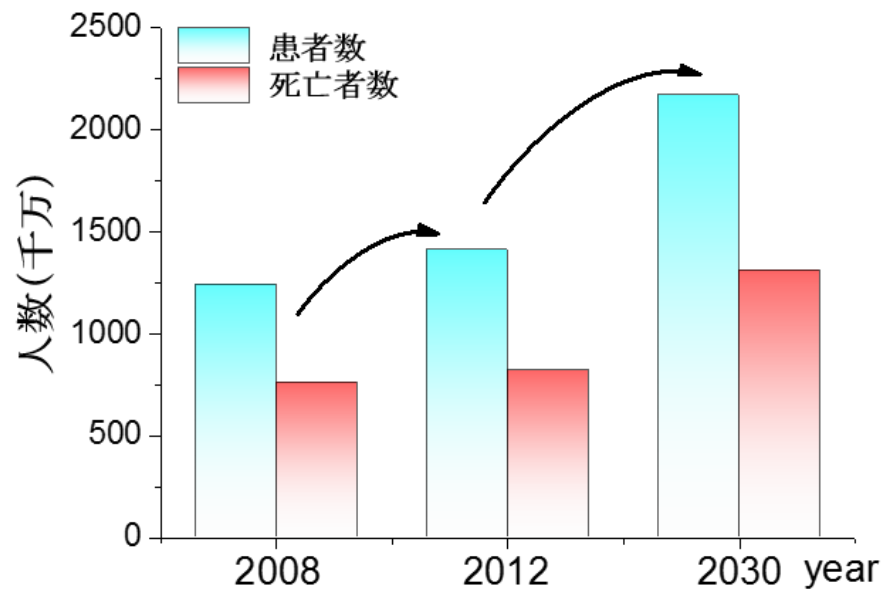


Figure 1.2. Estimated number of new cancer cases and number of cancer deaths by word area 2012[2].

現在、陽電子放射断層撮影検査法(Positron Emission Tomography, PET)は、がん検査の主流であるが、多くの部位での発見と判定が困難である。他の診断ツールとして、CT、腫瘍マーカーを標的とした血液検査等が行われているが、実際に陽性反応が出た時点では病態が進行してしまっていることも少なくなく、必ずしも早期診断につながっていない。早期発見の可能性を示すがんの殆どは、その早期臨床症状が不足している。また、現行診断方法が侵襲的で患者に苦痛を与え、コストがかかること、初期がんについて精度が低いこと、感染の恐れがあること、等々課題も多い。

がんの早期発見また治療のための最も良い方法は、血清または組織のバイオマーカーを使用することである。バイオマーカーは、がんの早期発見および治療のための最良方法として近年認識されるようになった。バイオマーカーとは、生物学的プロセス、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理学的応答

の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義され、広義的に日常診療で用いられるバイタルサインや、生化学検査、血液検査、腫瘍マーカーなどの各種臨床値や画像診断データなどが含まれる(**Table 1.1**) [4]。

Table 1.1. Classification of biomarkers based on purpose.

バイオマーカー種類	目的
診断マーカー (diagnostic marker)	疾患の診断に用いる
予後マーカー (prognostic marker)	特定の治療によらない疾病の経過を予測する
薬力学マーカー (pharmacodynamic marker)	薬剤の作用機序を見る
予測マーカー (predictive marker)	特定の治療による効果を予測する
代替マーカー (surrogate marker)	臨床試験の真のエンドポイントを代替する
モニタリングマーカー (monitoring marker)	疾患の判断や、治療への反応を見る
患者層別マーカー (stratification marker)	薬剤に関連した特定の分子を発現している患者を選別する
安全性・毒性マーカー (safety/ toxicity marker)	薬物の安全性、毒性を評価

生体組織の中には、数多くの化学反応が高精度で進行し、通常、健康な状態での血液中の代謝物の濃度は、殆ど一定の値を示す。しかしながら、E. Jellum が約 40 年前に提案したように、この生化学プロセスに何らかの欠損が生じた場合 (例えば、がんなどの疾患によって)、代謝物の濃度状態が変化するか、もしくは新しい代謝物が生成される[5]。過去 10 年間にわたって、分子レベルでのバイオマーカーに関する研究が飛躍的に進歩し、がんなどの致死率の高い病気の早期検査や治療への応用が期待されている。一般的に、核酸由来、ペプチド、タンパク質、代謝物、血管新生または

増殖、アポトーシス、低分子などがバイオマーカーとして注目されてきた (**Figure 1.3**)。バイオマーカーは、ヒトの血液サンプルから探索するのが最も効率的であると思われるが、血液や血漿のプロテオーム解析は容易ではない。田中耕一らは、「レーザーイオン化質量分析計用試料作成方法」を開発し、血液中のタンパク質を気化させて分析でき、病気の早期発見に大きな進歩となった。2002 年に「ソフトレーザー脱離イオン化法」としてノーベル化学賞を受賞した。しかし、タンパク質は、血液に豊富に存在するが、がん細胞に由来するタンパク質がただの 1%に過ぎない。その結果、肝臓由来タンパク質とがん由来のマーカータンパク質の間には 10 桁以上の濃度差が生まれる[6]。そして、人体にゲノム、プロテオーム、メタボロームは、それぞれ、約 25,000、100,000、4,000 種類が存在する。そのため、4,000 種類の低分子代謝物情報を比較的簡単に説明できると考えられる[7]。

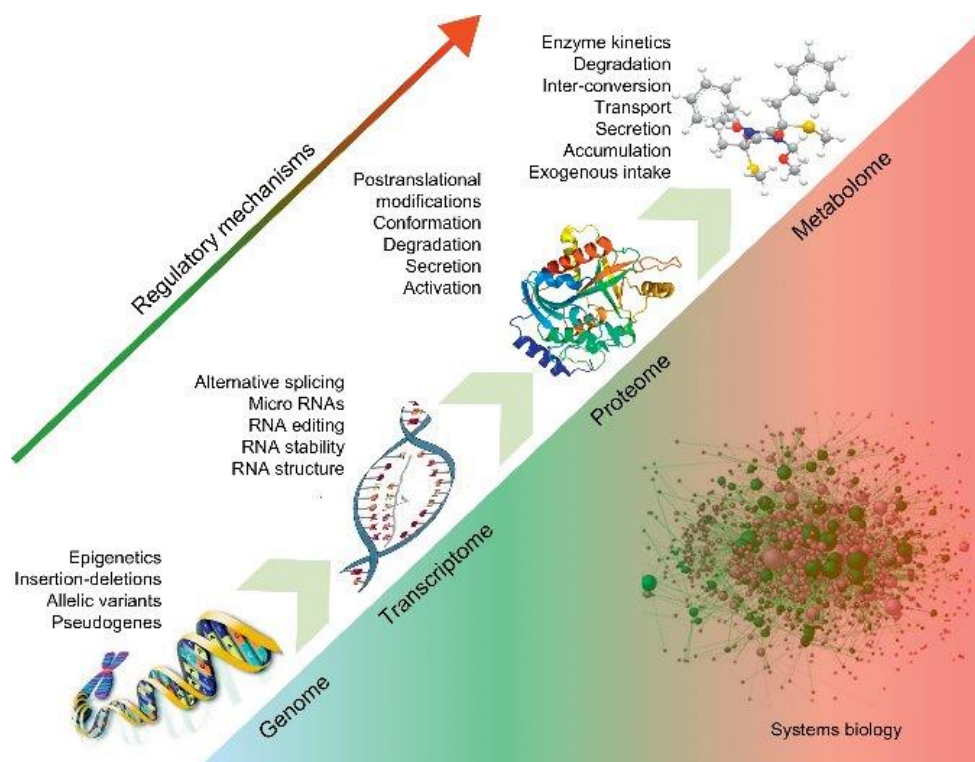


Figure 1.3. Systems biology. Regulatory processes at the DNA level affect the expression of downstream molecules, including RNAs, proteins, and metabolites [7].

近年、揮発性有機化合物 (volatile organic compounds : VOCs) の分析は、最も有望なメタボロームアプローチの一つで、異なるタイプのがんの早期発見のための潜在的な安全で、非侵襲的及び特異的な方法として関心が持たれている。がんなど様々な疾患と関連するため、分析方法の継続的な発展に伴い、VOC 定義による疾患診断が可能にされつつある[8]。VOCs は、人間、動物、植物、微生物などの代謝物の一部として生産されている。自然界には、約 200 万種類程度の VOCs が存在し、その中で約数十万種類が匂いとして存在する。食べ物に約 10,000 種類の VOCs が存在し、その 5% は匂いとして存在する[9]。VOCs は、沸点が 50~260℃であり、分子量が 300 以下である。VOCs は、主に芳香族(ベンゼン)、酸素含有化合物(アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸)、硫黄及び窒素、フッ素、塩素、臭素、硫黄、硫化水素、二酸化窒素、及びアンモニアなどを含める。人体において、VOCs は、呼気、血液、尿、唾液、糞便、汗などに存在し、体内から排出している。人体における VOCs の産生メカニズムは、主に、体内バクテリアの分解、様々な代謝経路を介して体内の様々な細胞からの分泌、タンパク質および酵素の変化により、改変された代謝物は、血液によって運ばれ、排泄肺から呼気中、または尿からの排出、皮膚(特に泌尿生殖器領域に)および粘膜からの分泌などによる体内の微小環境の変化、直径が約 1 cm ほどのがん組織の中央部で起こる組織の壊死、細胞呼吸プロセスに伴い、産生した活性酸素種(ROS)およびフリーラジカルが DNA、RNA、タンパク質などの細胞構造の破壊による VOCs 産生がある[8,10]。患者から排出される臭気分子情報に基づいてがんを初めとする様々な疾患の早期発見に関する研究が行われている。VOCs と疾患の相互関係は、分析技術の向上によって、その詳細な分子情報の同定が可能となり、匂いの特性に基づく診断が注目されている。

例えば、呼気の場合に約 3000 種類の VOCs が含まれている[11]。しかし、人の呼気に含まれる共通成分には約 20~30 種類が存在する[12]。呼気中の VOCs 成分の濃

度は、ピコモルレベル(10^{-12} mol/L)で非常に低く、呼気中の VOCs バイオマーカーによる疾患の診断が困難と言われている[12]。2006 年に Mcculloch らは、二週間ほど飼った犬に肺がん及び乳がん患者の呼気を健常者の呼気と区別する訓練を行い、肺がんに対する感度、特異性が共に 99%に、乳がんには感度が 88%、特異性が 98%に達した[13]。しかし、犬は、がんだけではなくがんに関わる炎症、感染または壊死に起因する臭気を識別している可能性があると言われた。また、犬の訓練に手間がかかる問題点がある。

1.2 揮発性低分子代謝物の識別

東洋医学には、望、聞、問、切の四診がある。望診とは、体を見ることで診査する方法である。主に顔や上腕、舌などの皮膚の血色を見て診断する。聞診とは、声の調子や呼吸音だけではなく、体臭や口臭などの臭いを嗅ぐことで診断する。匂いと疾患に関係性があると分かる[13]。人間を初めとする動物は、外で起きた変化または刺激を受け取るために嗅覚を発揮する。嗅覚は、多くの動物にとって生存に必須の重要な感覚である。更に、動物以外にも植物、線虫、昆虫に至るまで、殆どの生き物は、嗅覚が極めて重要な感覚となっている。数十万にも及ぶ匂い分子を識別する能力は、生物が持つ匂い分子を認識する嗅覚受容体遺伝子の種類と数によって決まる。人間と比べ、多くの動物の嗅覚が発達している。人間が持つ約 350 個の嗅覚受容体遺伝子に対し、原始的な線虫は約 500 個、犬は約 800 個、最近の研究でアフリカゾウは約 2000 個で一番多く持っていることが解明された (**Figure 1.4**) [14]。人間をはじめとする生物による匂い(VOCs)の認識への理解は、低分子代謝物の分子情報の獲得、更に、疾患相関の解明およびその検知にとって重要である。

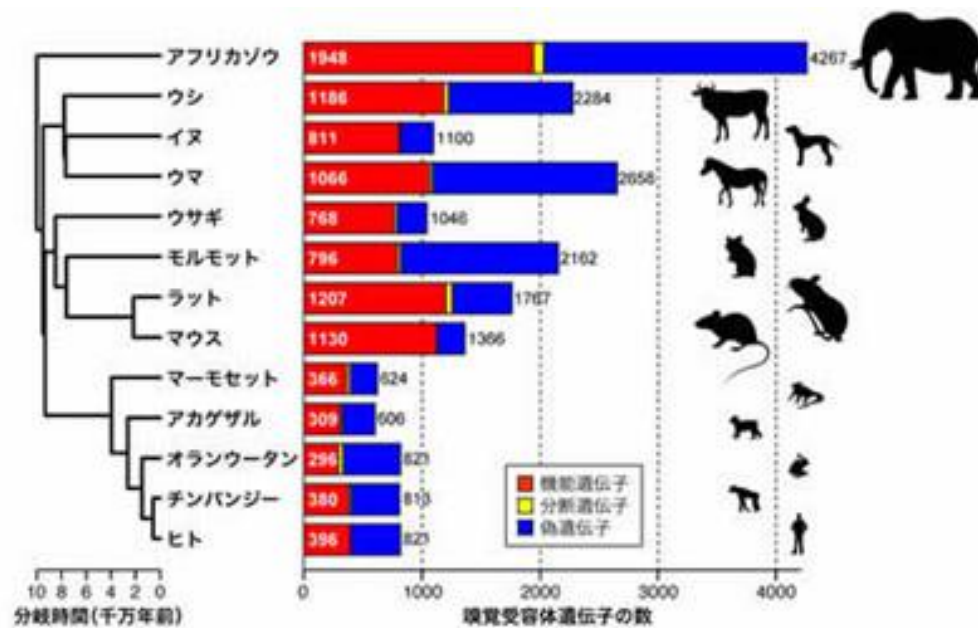


Figure 1.4. Numbers of OR genes in the genome sequence from 13 placental mammal species [14].

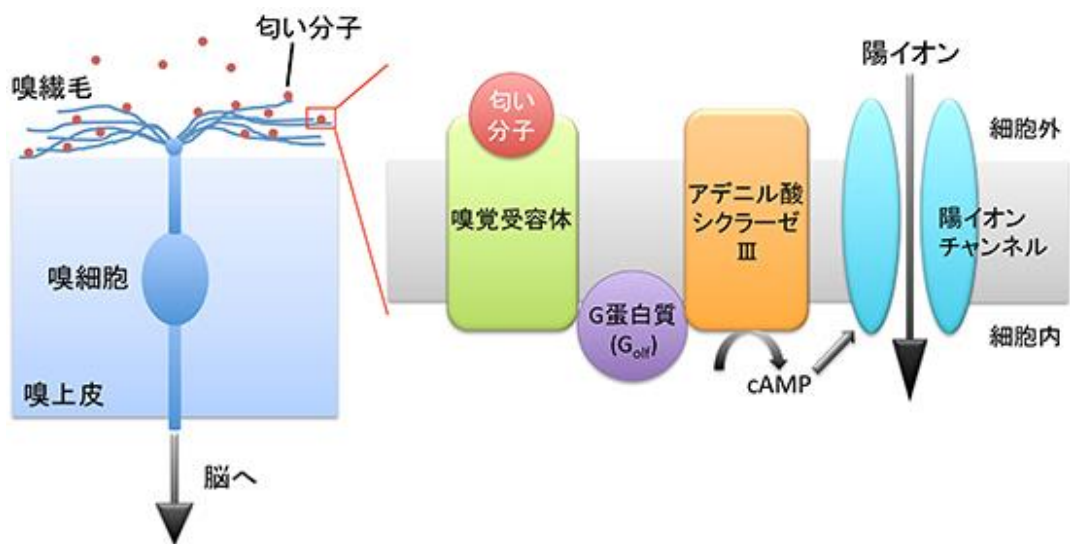


Figure 1.5. Mechanism of olfactory of living organisms [15].

Richard axel と Linda buck は、匂いの受容体遺伝子の発見と嗅覚感覚の分子メカニズムの解明を遂げ、2004 年度のノーベル医学生理学賞を受賞された。嗅覚受容体遺伝子は、ラットで初めて同定され、G タンパク質共役型受容体であることが示された[16]。匂い分子は、嗅細胞に存在する受容体と結合して嗅細胞電位を変化させる。細胞電位は、嗅神経部位においてインパルス信号に変化され、匂い情報が脳に送られる[17]。

一般的な生物の嗅覚のメカニズムを **Figure 1.5** に示した。嗅神経、嗅繊毛で匂い分子を捕らえた嗅覚受容体は、三量体 G タンパク質を活性化し、セカンドメッセンジャーである cAMP が産出される。cAMP 濃度の上昇に伴い、環状ヌクレオチドイオン性カルシウムチャネルが活性化され、カルシウムイオンが流入する。更に、流入したカルシウムイオンによってカルシウム依存性クロライドチャネルが開口することにより、嗅神経細胞は、匂い刺激を受け取ってから数百ミリ秒以内に脱分極する。脱分極した嗅神経は、軸索を通じ、二次神経への乗り換えが起こる嗅球へその電気信号を伝える。すなわち、嗅神経軸索は、系球と呼ばれる構造体内の僧帽、房飾細胞とシナプスを形成して信号を受け渡し、外側嗅索を経由し、脳中枢へと連絡する[18]。

匂い成分は、嗅上皮を被っている嗅粘液(鼻水)やリンパ液に溶け、匂い受容体と結合するため、わずかでも水に溶ける性質を持っている物質でないと嗅受容膜まで到達できない。また、嗅粘液やリンパ液に含まれている成分は、匂い成分と匂い受容体間の結合を調節する重要な役割を果たしている[19]。Takeuchi らは、匂い受容体タンパク質が発現した立体組織を利用した空気中での匂いの感知に成功している。ハマダラカの匂い受容体は、緩衝溶液中で 2-メチルフェノールより、ベンズアルデヒドに高い反応性を示したと報告した[20]。匂い受容体を利用したセンサーの開発には、動物の鼻を模倣した嗅粘液層のような薄い液体(緩衝溶液)の層を匂い受容体表面に再現すること、簡便で安価な測定装置で匂いに対する反応を検出できることの 2 つの技術開発

が必要である。しかしながら、匂いの大多数は、親油性のため水に溶けにくい、疎水性の高い物質のほど低濃度で匂いがする物質も多く存在する。例えば、昆虫の感覚子内は、リンパ液(感覚子リンパ)で満たされているため、揮発性で水に溶けにくいフェロモンや匂い分子が感覚子リンパ中に高濃度で存在するフェロモン結合タンパク質または匂い結合タンパク質と結合することで可溶化され、樹状突起膜上に発現する嗅覚受容体へと移行すると考えられている。

人間は、呼気に伴い、吸い込まれる匂い分子を感知し、空気中に揮発しやすい物質にしか反応しないが、昆虫(触角でにおいを感知)や水中に住む動物(水に溶けているにおい分子を感知)は、より多くの匂いを感じ取ることができる。哺乳類や昆虫は、それぞれ異なる匂い溶解、受容機構を機能し、匂いを認識する。昆虫の触角上には、感覚子と呼ばれる多数の突起状の感覚器が存在しており、嗅覚感覚子は、クチクラ上に多数の嗅孔をもつ多孔性感覚子である。嗅覚感覚子の内部には、複数の嗅覚受容細胞があり、匂い受容部位である樹状突起を感覚子内へ、軸索を中大脳にある触角葉とよばれる嗅覚情報処理の一次中枢へ伸ばしている。匂い分子は、触角上の嗅覚感覚子のクチクラへの吸着、拡散を経て、嗅孔を通り感覚子内部へと入る。感覚子内は、リンパ液(感覚子リンパ)で満たされているため、揮発性で水に溶けにくいフェロモンや匂い分子は、感覚子リンパ中に高濃度で存在するフェロモン結合タンパク質(pheromone binding protein : *PBP*)、または匂い結合タンパク質(odorous binding protein : *OBP*)と結合することで可溶化され、樹状突起膜上に発現する嗅覚受容体へと移行すると考えられている。また最近 *PBP* はフェロモンの可溶化・移行の機能だけでなく下記に示す嗅覚受容体の活性化にも必須であるという結果が報告されている。結合タンパク質により可溶化された匂い分子が受容細胞の樹状突起膜上に発現する嗅覚受容体と結合すると、受容細胞の脱分極が引き起こされ、活動電位が発生し匂い受容シグナルが触角葉へ伝えられる[21]。

1.3 固相マイクロ抽出法(SPME)による揮発性低分子分析

1.3.1 固相マイクロ抽出法(SPME)とは

ライナス・ポーリングは、20 世紀における最も有用な化学者の一人として広く認められている。量子力学を化学に応用した先駆者であり、化学結合の本性を記述した業績により、1954 年にノーベル化学賞を受賞した。彼は、1971 年に“ひとりの人間の遺伝的性質に関する情報は、その身体で起きている多くの化学反応速度の反映であることから、体液の定量的分析を通して与えられる。さらに、体液の定量的分析を通して、現在よりもより効果的な方法で多くの疾病の診断を行うことができるかもしれない”と述べた。そして、彼は、最初にヒト尿および呼気中の代謝物の分析による疾患診断という新しいアイデアを提唱した。ライナス・ポーリングらは、気液分配クロマトグラフィーを開発し、ヒトの呼気および尿試料からそれぞれ、約 250 と 280 成分物資の定量測定を可能にした。その技術によって、数日後に体液の組成を一定(標準偏差約 10%)にすることができ、有意な定量分析が可能となった。人間が数日間食事を完全に取りない場合、体内のほとんどの小分子が胃から血液中に吸収される。結果的に、ヒト腸内細菌は、栄養不足で消滅することを判明した[22]。

1990 年代は、分離分析技術が未発達であり、かつ測定機器が極めて高価であったため、個々の代謝物を正確に定性・定量することによりも試料中の代謝物パターンを総括的に評価する手法、所謂メタボリック・プロファイリングが主流であった。それまでは、分離装置のない検出装置、主に核磁共鳴装置(NMR)や赤外分光器(IR)、質量分析器(MS)を使用して、試料を分離せずに検出したスペクトルを得ていた。1990 年代後半から液体クロマトグラフィー(LC)における親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムの発明やガスクロマトグラフィー(GC)の普及、キャピラリー電気泳動(CE)メソッドの開発が盛んになり、質量分析と組み合わせることでより多くの低分子代謝物を正確

に一斉分析することが可能になった[23]。

Table. 1.2 に示したように、現在、低分子代謝物の分析手法としては、主に、フーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光測定、ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS)、代謝産物の配列、核磁気共鳴 (NMR) 分光法、ラマン分光法および薄層クロマトグラフィー (TLC) などが利用されている[24]。その中で、LC-MS と GC-MS は、カラム分離と質量分析を同時に展開することができ、他の手法と比べ、安価で高い分析感度を持つため、最も利用されている低分子代謝物の定性・定量分析手法である。しかし、LC-MS は、GC-MS より高価であり、液体クロマトグラフィーの再現性に依存する(ガスクロマトグラフィーよりも制御が難しい可能性がある)。また、陽イオンおよび陰イオンの存在下で代謝産物のイオン化が不十分であるイオン抑制にも苦しむ可能性がある。GC-MS は、高い感度を有する比較的安価で再現性のある方法であり、高分離能、豊富なライブラリ情報(約 15,000 件、National Institute of Standards and Technology: NIST, 国立標準技術研究所)、安定で再現可能な測定などの利点を持つ。質量分析などによって解析されつつであるメタボロミクス情報は、その膨大なデータを効率よく解析し、研究者自身が得られた実験結果を整理し、データベース化する必要がある。これまでの知見を新規バイオバイオマーカーの発見や疾患の診断と関連付ける課題に対処するために、メタボロミクスデータベースが出現している。そのようなデータベースの 1 つは、ヒトメタボロームデータベース (human metabolome database : HMDB) である。HMDB は現在、世界最大かつ最も包括的な、生物特有のメタボロミクスデータベースである。HMDB データベースには、40,000 を超える代謝産物、数千の代謝産物濃度、700 以上の代謝および疾患関連経路、ならびに数十の癌バイオマーカーに関する情報が含まれている[25]。

Table 1.2. Analytical methods of low molecular weight metabolites and their comparison.

テクニック	説明	メリット	デメリット
Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry	代謝産物の振動周波数を使用して代謝の指紋を生成する。	ハイスループットの最初のスクリーニングには安くて良い。酵母呼吸鎖変異体を野生型株と区別するために使用される。	どの代謝産物が変化を引き起こす原因であるかを特定することは非常に困難である。あるクラスの化合物内の代謝物を区別するのに非常に貧弱である。
Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)	異なる代謝産物を同定するために、ガスクロマトグラフィーを用いて質量分析に先立ち代謝物混合物を分離する。	高い感度を有する比較的安価で再現性のある方法。	サンプルの調製には時間がかかる。すべての化合物がガスクロマトグラフィーに適しているとは限らない。
Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)	液体クロマトグラフィー中に分離を除いて、GC-MSに対する同様のアプローチが生じる。	試料調製が時間がかからず、GC-MSの代わりに使用されている。GC-MSと同様の感度である。	GC-MSよりも高価であり、液体クロマトグラフィーの再現性に依存する(ガスクロマトグラフィーよりも制御が難しい可能性がある)。陽イオンおよび陰イオンの存在下で代謝産物のイオン化が不十分であるイオン抑制にも苦しむ可能性がある。
Metabolite arrays	表現型解析のための96ウェルプレートアッセイシステムを使用する。700の異なるアッセイ混合物によって大腸菌を表現型化するために使用されている。	与えられた状況のために生産された時のスクリーニングツールとして優れている。	測定可能な代謝産物の数は、チップ上に置かれた数によって制限される。未知のものをスクリーニングし、生体異物の代謝を追跡することは困難である。
Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy	製薬業界および患者の尿および血漿サンプルのスクリーニングにおいて広く使用されている。	非侵襲的技術 NMR分光法の使用は、ヒトにおける組織の代謝分析が可能であることを実証する。完全に自動化され、高い再現性を有する。簡単な1次元スペクトルから代謝産物を同定することは比較的容易である。	質量分析より感度が低い。共鳴代謝産物は定量化するのが困難な場合がある。薬物代謝産物は関心のある代謝産物と共鳴することができる。
Raman spectroscopy	FT-IRおよび紫外/可視分光法の拡張。レーザー照射後の光散乱に依存する。	水は弱いラマンスペクトルしか持たないため、多くの官能基を観測することができるという点でFT-IRより優れている(例えば、炭素-炭素結合のより良い区別など)。	どの代謝産物が変化を引き起こす原因であるかを決定することは非常に困難である。区別するクラスの化合物では非常に貧しい。
Thin-layer chromatography (TLC)	異なる培養条件下で大腸菌(E.coli)中の14 C-グルコースの代謝運命に従うために使用される。	安価	アッセイ間の変動で、定量化できる代謝産物の点で制限されている。

一般に、VOCs の分析方法は、ガスクロマトグラフィーの炎イオン化検出器または電子捕獲検出を用いた質量分析(GC-MS)法などが挙げられる[26]。それに合わせて、VOCs 試料の調製方法は、物理的、物理化学的および化学的方法を含めて非常に広い。近年では、液体-液体、液体-固体、気体-液体、気体-固相における VOCs 分子挙動の例が挙げられるが、この分野では、物理化学的方法が主流である[27]。Pawliszynらは、1990年にジメチルポリシロキサン(polydimethylsiloxane, PDMS)ポリマーコーティング材料で修飾したステンレス製ファイバーによって様々な VOCs を回収するいわゆる SPME 法(固相マイクロ抽出法、solid phase microextraction)を初めて報告した(Figure 1.6)[28]。それから SPME 法は、最も一般的な試料中の VOCs の高感度な抽

出方法として使用してきた。従来の VOCs 分析方法は、SPME 技術の導入によってさらに改善されるため、SPME に関連する研究が増加する一方である(**Figure 1.7**)。ヘッドスペース方式固相マイクロ抽出法(Head Space-SPME, HS-SPME)は、液体や固体試料の上部の空間に揮発したガス状成分を吸着する基本的な SPME 技術であり、最も使用されている方法として知られている(**Figure 1.8**) [29]。それから、環境分析以外に、HS-SPME による食品分析、工業分析およびバイオテクノロジーにも適用されるようになった[30]。

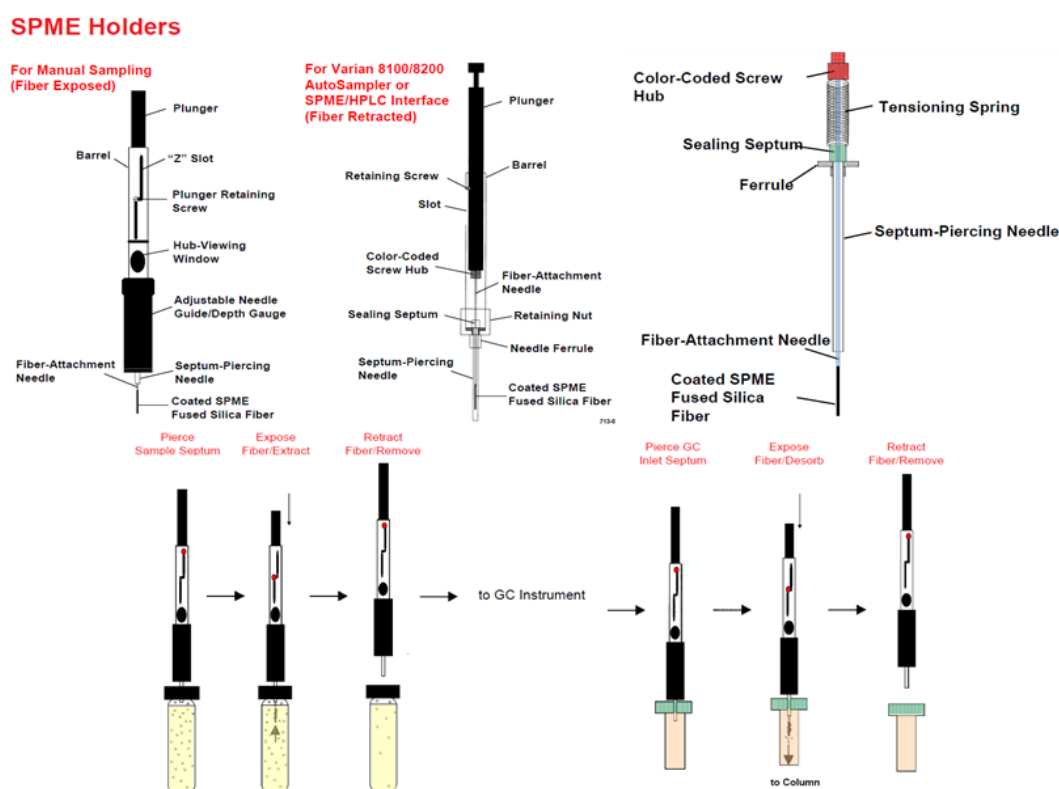


Figure 1.6. Schematic diagram of SPME fiber [31].

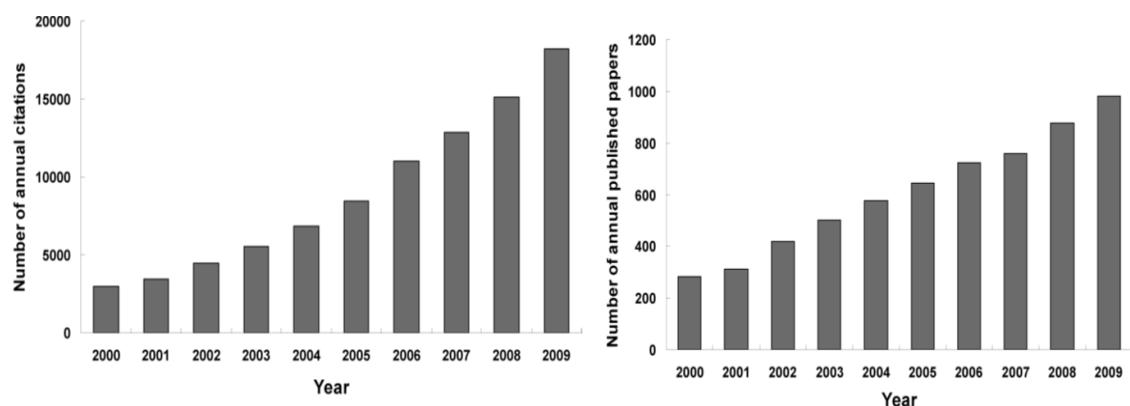


Figure 1.7. Summary of the published SPME papers and the citations during the past decade [32].

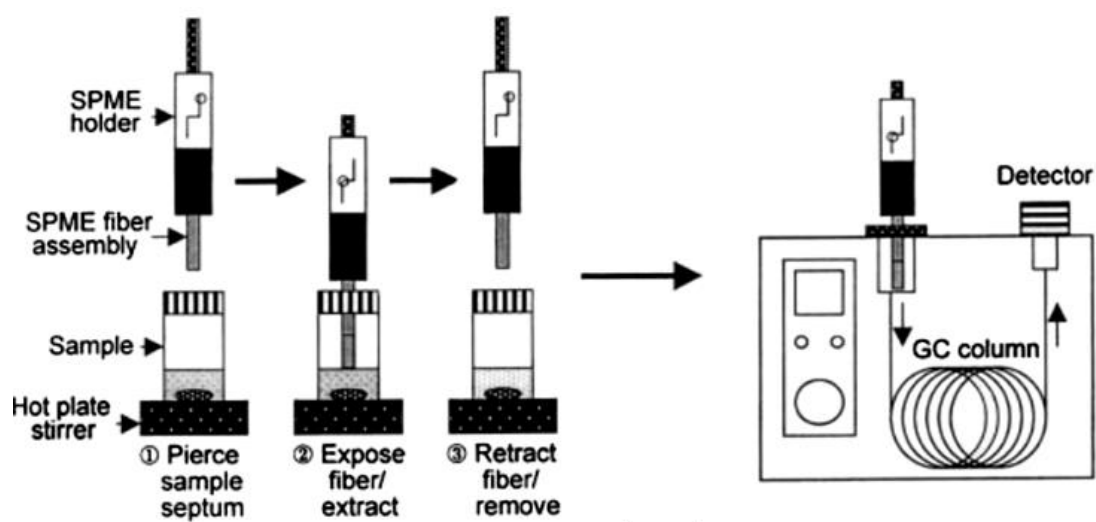


Figure 1.8. SPME procedure for GC. Reprinted from *Journal of Chromatography A*, **880** [33].

SPME は、複数の平衡によって構成される。抽出システム全体が閉じた系の内部にある時、平衡は、SPME 繊維コーティング相、ヘッドスペース気相、水溶液相の 3 つの相によって形成される。試料の総量は、抽出の間に変化せず、以下の式に従う。

$$C_o V_s = C_h^{\infty} V_h + C_s^{\infty} V_s + C_f^{\infty} V_f \quad (1)$$

ここで、 C_0 は、水溶液中の試料の初期濃度であり、 C_h^∞ 、 C_s^∞ 、 C_f^∞ は、それぞれ、ヘッドスペース、水溶液および SPME 繊維コーティングにおける試料の平衡濃度である。 V_h 、 V_s および V_f は、それぞれ、ヘッドスペース、水溶液および繊維被覆の体積である。VOCs のヘッドスペースが閉じたバイアル管内に存在する場合、 C_h^∞ 、 V_h は、省略することができ、式 1 は、単に水溶液と繊維コーティングとの間の関係で解釈される。

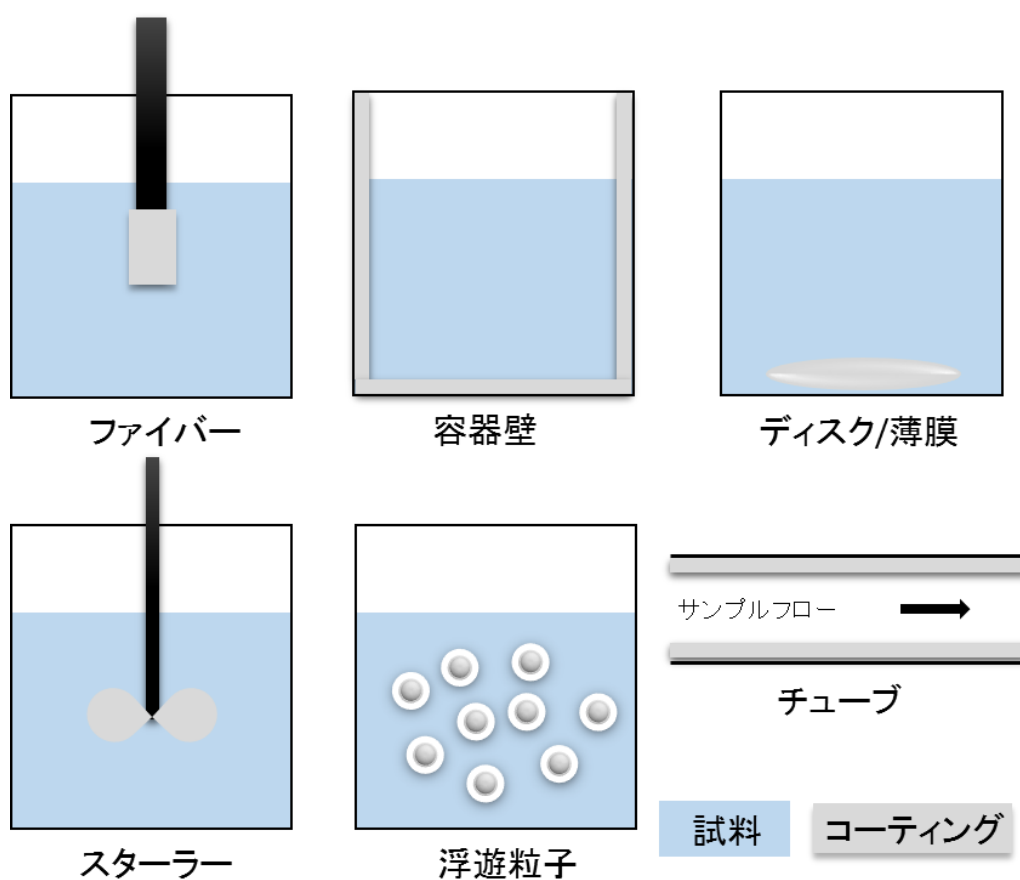


Figure 1.9. SPME is a three phase system between aqueous solution, headspace and fiber coating.

Figure 1.9 は、いくつかの SPME サンプルング方式を示した。SPME 法には、主に直接抽出法とヘッドスペース抽出法という 2 つの VOC サンプルング法が存在し、それぞれ、ダイレクトおよびヘッドスペースサンプルング (head space, HS) 法と呼ばれている。

HS-SPME 法は、SPME の典型的な例として最もよく知られているが、まだいくつかの問題が残っている。例えば、吸着に利用可能な SPME 繊維の全表面積がコーティング容積に比例するため、吸着容量が制限される。製品は、製造業者によって大きく異なる。SPME カートリッジは、プラスチックから構築されるため、大量の試料中では分析物以外の汚染物(不純物)を吸着し、干渉を受ける[28]。更に、水溶液からの VOC 抽出において、揮発性および非極性の化合物検体は、半揮発性物質または極性揮発性物質よりも速く抽出される[34]。

1.3.2 ダイレクト抽出法

ここで、直接抽出法として知られるダイレクトサンプリング手法を紹介する。式 2 に示したように、 K_{fx} は、繊維コーティングと水相との間の分配定数であり、

$$K_{fx} = C_f / C_s \quad (2)$$

C_f および C_s は、それぞれ、固相および水相中の有機化合物の濃度である。 k は、固体/水相系の分配係数である。分配比 k は、以下の式で求められ、

$$k = C_f V_f / C_s V_s = n_f / n_s = K_{fx} V_f / V_s \quad (3)$$

n_f および n_s は、繊維コーティングおよび水溶液中のモル数であり、 V_f および V_s は、繊維コーティングおよび水溶液の体積である。吸着剤は、有機化合物に対して高い親和性を有するため、 K_{fx} は、非常に大きい。そのため、SPME 抽出ファイバーは、非常に良好な感度を有する。しかしながら、 K_{fx} は、マトリックス中の全ての検体を徹底的に抽出するのに十分ではない。そこで、2 つの異なる式を使用し、SPME ファイバーによ

って吸収される量を決定する。これは、サンプル容積に依存する。大きな試料体積 ($V_s > 5 \text{ ml}$) の場合、繊維コーティングによって吸収される検体の量は、平衡状態で最初の水性濃度 C_o に正比例する。 V_s が非常に大きい場合は、次式が使用される。

$$n_f = K_{fx} V_f V_o \quad (4)$$

ここで、 n_f は、繊維被覆によって抽出された量である。一方、試料体積が 2～5 mL のように非常に小さい場合、試料は、著しく吸着される。その場合、吸収される量は、式 5 で求めることができる。

$$n_f = K_{fs} V_f V_s C_o / K_{fs} V_f + V_s \quad (5)$$

この場合、分布定数 K_{fs} は、非常に大きく、 $K_{fs} \geq V_s$ であることから、ほぼすべての検体が SPME 繊維コーティングに移動したことを意味する。

SPME は、水溶液、ヘッドスペースおよび繊維コーティングの間の三相系である。このシステムでは、抽出された分析の量は、ヘッドスペースまたは液体中の吸着剤の位置に依存しない。従って、ヘッドスペースと水溶液との間の分析抽出感度は、同じであるが、高揮発性化合物に関しては例外である。

VOC 化合物のヘンリー(Henry's)定数が高い場合、バイアル管内のヘッドスペース中の VOCs の多くが非常に速く抽出される。一方、Henry's 定数が低い時、VOCs がコーティングから拡散し、SPME ファイバーに到達するまでに要する抽出時間が長くなる。

K が Henry's である場合、 P は、圧力であり、 S は、分析サンプル液中へのガスの溶解度である[35,36]。方程式 7 に基づいて、ガスの溶解度は圧力に比例する。その結

果、VOCs は、ヘッドスペースと液体の 2 つの相に存在する。

$$K = \frac{P}{S} \quad (6)$$

$$K = \frac{\text{Analysis(gas)}}{\text{Analysis(liquid)}} \quad (7)$$

ここで K は、平衡定数であり、気相および液相中のガス量である。次に、気体と液体が n_G と n_L のモルに等しいことがわかる。ガス中の分析モル数については、以下の式に従い、

$$PV = n_G RT \quad (8)$$

$$\therefore n_G = \frac{P}{RT} \quad (9)$$

ここで V は、1 であり、分析は、平衡状態にあり、

$$n_G R = K \times n_L \quad (10)$$

$$K \times n_L = \frac{P}{RT} \quad (11)$$

$$\therefore n_L = \frac{1}{K} \times \frac{P}{RT} \quad (12)$$

上記の式から、 K は、 P (圧力) に比例して T (温度) に反比例する。要約すると、式 (6) ~ (12) により、SPME は、pH、塩、添加剤および物理的 (温度など) の条件のような極限化学物質に依存する。水溶液からの抽出において、揮発性および非極性の化合物 VOCs は、半揮発性物質または極性揮発性物質よりもずっと速く抽出される。この場合、温度は、VOCs の蒸気圧を決定するため、プロセスの動態に大きな影響を与える。ヘッドスペースプロセスは、VOC 化合物が膜を通して拡散し、その後コーティングに到達する必要があるため、ダイレクト抽出法より遅い。抽出時間を短縮するためには、抽出薄膜を使用することや抽出温度の上昇が必要である[28,34]。

1.3.3 抽出方式の最適化—薄膜抽出法

薄膜抽出法 (Thin Film Microextraction, 以下 TFME) は、Pawliszyn らによって 2003 年に初めて提案された[37]。揮発性が低い半揮発性の VOC 分析に新たな可能性を導かれた論文となる。Pawliszyn らは、PDMS-SPME ファイバーを用いて半揮発性 VOC 化合物の水溶液に直接差し込んで、回収したところ、非常に高い抽出効率が確認された。近年、TFME は、抽出相の体積と表面積、熱および化学的安定性、高い気孔率などの利点から、従来の SPME 法より高い VOC 抽出効率と感度を提供する。21 世紀に入ってから、TFME を利用した VOC などの分析が注目されるようになってきた (**Figure 1.10**)。近年では、TFME に関する研究報告が増加する一方で、多くの研究分野で利用されるようになった (**Figure 1.11**)。

Reyes-Gares らは、親水性-親油性にバランスの取れたポリアクリロニトリル系の抽出薄膜を開発し、血液や尿中 VOCs の分析を行った[38]。Bessonneau らは、同様な抽出方法を唾液中の VOC 分析に展開した[39]。両方とも TFME 薄膜の大きい表面積の利点を利用して高感度な VOC 分析を可能にしている。Jiang らは、PDMS のメンブレンサンドイッチ抽出膜を使用して、皮膚の揮発ガスの TFME-GCMS 分析を行い、臨床

および法医学捜査分野での応用可能性を示した[40]。

Kermani らは、典型的な SPME の抽出材料である Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)膜と polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB)膜をスピンコーティングで作製し、水中の極性 VOCs の迅速かつ効率的な薄膜抽出を実現した。膜の厚さは、スピンコーティングによって容易に制御できた[41]。

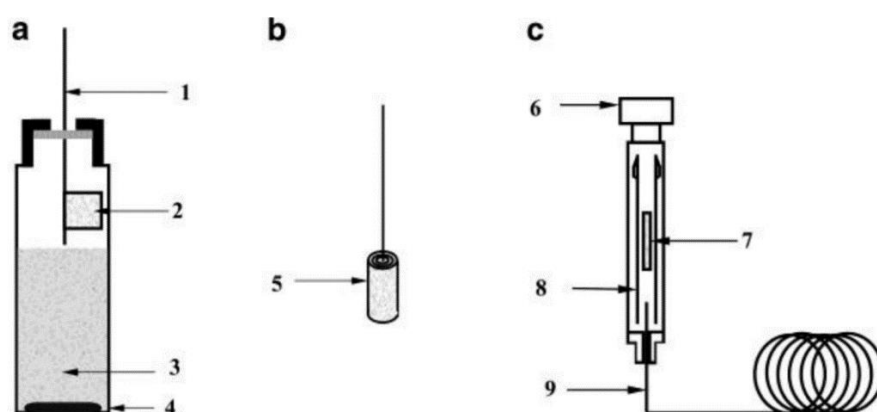


Figure 1.10. Drawing of the headspace membrane SPME system. 1. Deactivated stainless steel rod. 2. Flat sheet membrane. 3. Sample solution. 4. Teflon-coated stirring bar. 5. Rolled membrane. 6. Injector nut. 7. Rolled membrane. 8. Glass liner. 9. Capillary column.

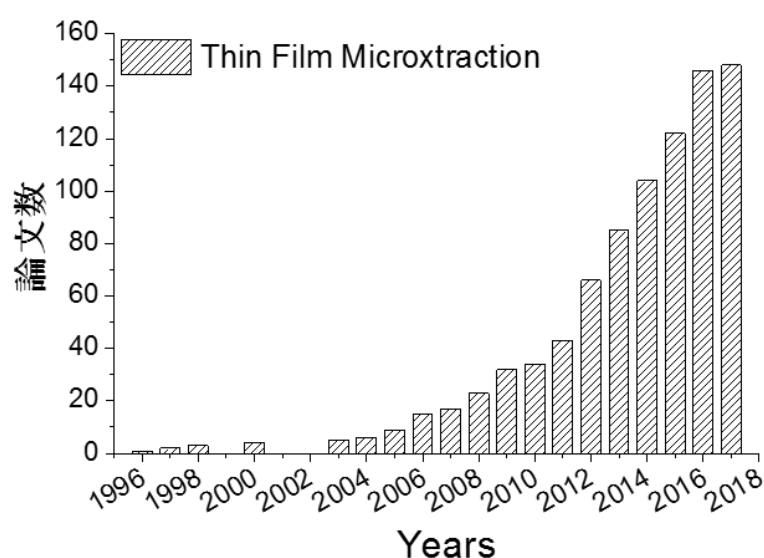


Figure 1.11. Summary of the published TFME papers during the past [42].

1.3.4 抽出材料の最適化—多孔質材料の導入

抽出方式と抽出条件以外に、最も重要な要素は、SPME 表面にコーティングされた抽出材料である。PDMS ポリマーは、知られている最も一般的なものであり、**Figure 1.12** に示されている。PDMS は、容易な加工性、気体透過性、異なる基材への容易な接着および結合、生体適合性、透明性、デバイス製造のための低コスト処理のために、チップ上 (LOC) およびマイクロ流体解析プラットフォームにとって好ましい材料となっている[43]。シリコン中のケイ素-酸素 (Si-O) 鎖の高い柔軟性は、ネットワーク内のガス拡散を可能にする自由空間である「開口部」を提供する。PDMS ポリマーは、有機分子との良好な界面接着およびの良好な分子相互作用を提供する。また、調整可能な PDMS 鎖構造は、分子輸送のための高速選択的拡散チャネルを可能にし、有機分子に対して良好な透過性および選択性を示す。

水溶液中のガス分子は、PDMS 膜と水溶液の界面を通過し、膜内部に拡散し、最後に膜から蒸発する。ガス透過率は、所与のガスおよびゴムの特定の関数であり、溶解度および拡散速度の両方に依存する。

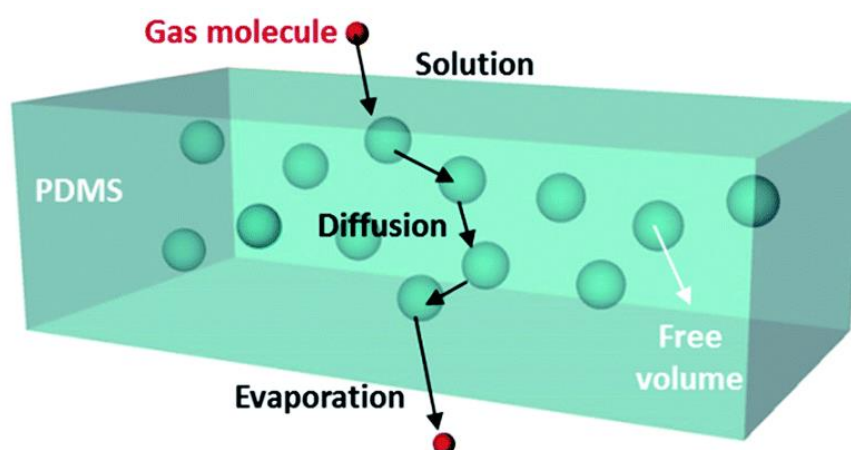


Figure 1.12. 3D scheme representing the gas diffusion mechanism in a PDMS membrane [43].

PDMS ポリマーは、ポリマーベース剤(シロキサンオリゴマー)と硬化剤との架橋反応によって作られる(**Figure 1.13**)。PDMS ポリマーの架橋ネットワーク内の未反応種の最小量を得るためにシロキサンポリマー剤と硬化剤を 10:1 の比率で混合する。架橋剤の量を減少させると徐々に緩やかなポリマー構造が得られ、より高い密度の自由空間が得られる。Berean らによって報告されたように、硬化温度による異なる自由空間の形成挙動が観察された。75℃は、最適な PDMS ポリマーの架橋温度であり、100℃を超えるものよりも、最も高い気体透過性を有する膜をもたらした。PDMS ポリマーは、75℃の条件下で最高強度の Si-H 結合を結合し、より緩和したポリマーマトリックスがもたらされた。したがって、最適化された構造および余分な自由空間は、ガスの拡散速度を増加させ、気体分子をポリマーマトリックス内でより容易に移動させることを可能にする[44]。

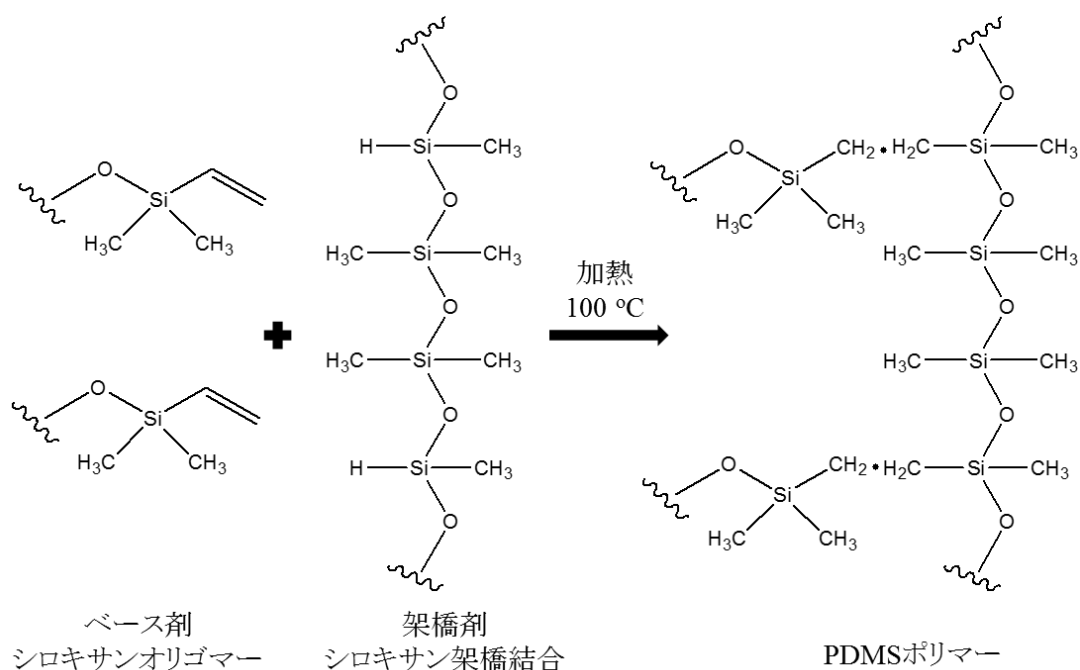


Figure 1.13. The Structure of the PDMS material after polymerization reaction.

固体コーティングの特性は、抽出時間を決定し、どのような種類の被分析物を吸着できるにとって重要である。PDMS だけではなく材料の抽出に関する研究は、興味深い分野である。分析物の抽出は、吸着材料の特性に強く依存するために、PDMS は、ポリアクリレート (PA)、カルボワックスポリエチレングリコール、カルボキシシ、ジビニルベンゼンなどの材料と複合することが行われている。PDMS と他の吸着材量の複合吸着 SPME ファイバーは、既に市販されており、例えば、carboxen/PDMS, divinylbenzene/carboxen/PDMS, PDMS/divinylbenzene などが存在する。吸着材の特性は、吸着できる有機物の性質や分子量を決定する (Figure 1.14)。

抽出材料の極性は、極性抽出材料と非極性抽出材料の 2 種類に分けることができる。吸着剤は、分析の特性を決定することができる。SPME コーティングが NH_2 、 OH 、 COOH などの多数の水素結合基を有する場合、それらは、極性化合物の吸着に使用することができる。PDMS は、非極性吸着剤であり、非粘着性化合物に対して良好な感度を示すが、より広範な VOC 化合物分析のために、PDMS の複合材料が望ましい。

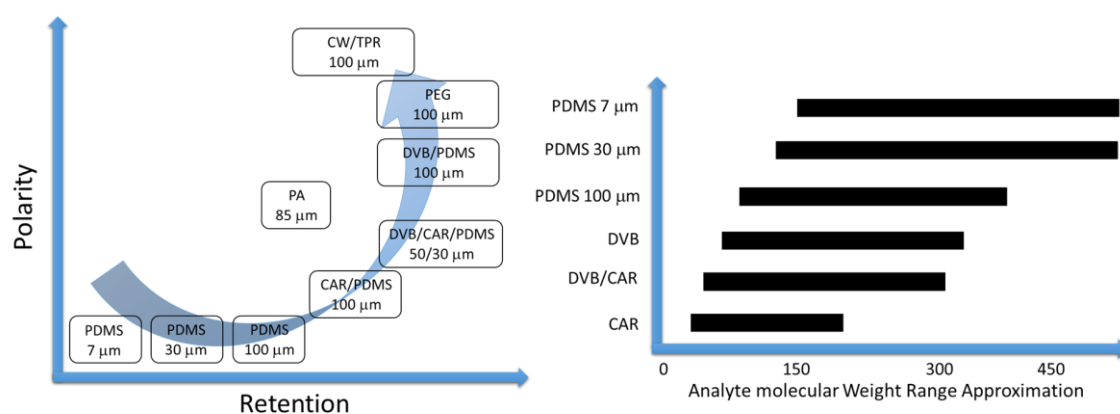


Figure 1.14. Properties of commercially available SPME fibers. CW/TPR, carbowax/templated resin; PEG, polyethylene glycol; PDMS, poly(dimethylsiloxane); DVB, divinylbenzene; PA, polyacrylate; CAR, carboxen and the analyte molecular weight range approximation.

Dixon らは、SPME 繊維材料および抽出条件、例えば、物理的パラメーター、抽出の時間および温度などが VOC 収集のための重要な因子でもあることを報告した[45]。また、PDMS 材料とポリアクリレート(PA)、カルボワックスポリエチレングリコール、カルボキシシン、およびジビニルベンゼンとの混合吸着相を提案した[46]。VOCs 分析と SPME コーティングとの吸着相互作用を理解するために、SPME コーティングは、ベンゼン環を有する炭素材料、官能基を有する炭素材料、脂肪族炭化水素の 3 つのグループに分類することができる。コーティングの特性(疎水性、電子分極率、極性など)は、分析対象を決定することができる。これまでに、ほとんどの研究は、ポリマー、炭素材料の使用に集中してきた。近年、SPME コーティング材料の特性に関する研究は、優れた VOC 分析のための新たなトピックである。様々な材料の導入により、SPME の新たな可能性が導かれ、in vivo、in vitro 分野における VOCs の抽出および分析に役に立つ[47-50]。

Zhang らは、グラフェン被覆 SPME 繊維が多環式芳香族炭化水素に対して良好な吸着特性を有すると報告した[51]。Layer-by-Layer 法で作製したグラフェン膜の被覆 SPME 繊維を使用して、市販の PDMS-SPME ファイバーと比較して、ナフタレンに対して 2 倍、ベンゾフルオランテンに対して 17 倍と高い濃縮係数を示した。VOC バイオマーカー検出のための Au-Ag ナノ粒子および多層カーボンナノチューブ(MWNTS)から形成された新しい吸着材料が報告された[52]。Ligor らは、PDMS、ポリアクリレート(PA)、エトキシポリジメチルシロキサン(PDE)、ポリウレタンアクリレート、溶融シリカおよびフッ化水素酸のエッチング後の溶融シリカを SPME 繊維にとして被覆した場合、芳香族炭化水素(ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、m、p-キシレン)に対する抽出効率を検討した。その SPME 抽出ファイバーは、市販の PDMS と同じ抽出効果を示した[53]。Dixon らは、CAR-DVB-PDMS (50/30 μm)、CAR-PDMS (85 μm)、DVB-PDMS (65 μm)、PDMS (7 μm) および PEG (60 μm) でコーティングした SPME ファイバ

ーを利用し、ヒト糞便中の VOC メタボロミクス分析を行った。その結果、全 8 種類の VOC 抽出ファイバーを使用した場合、得られる総代謝物の約 90%を集合的に単離できることを報告した[45]。その他に、最近、多くの新たな SPME コーティング材料が開発されるようになり、例えば、イオン性液体/高分子イオン性液体[54]、分子インプリントポリマー[55,56]、金属/金属酸化物ナノ粒子[57,58]、炭素系ナノ材料(例えば、カーボンナノチューブ (CNT)[59,60]、カーボンナノコーンまたはナノディスク[61]、グラフェン[51,62-64]など多く存在する。また、金属有機フレームワーク(MOFs)は、多孔質体材料として知られており、その高い吸着特性を生かして、最近、SPME との組み合わせが注目を集めている[65]。他に、近年様々な材料(有機、無機、有機無機ハイブリッド)を利用した SPME の研究例を **Table. 1.3** にまとめた。

Table 1.3. Selected applications of fiber SPME techniques in analysis.

No.	Extract material	Substrate	Fabrication method	Mode	Analytical method	Analyte and Matrix	LOD or LOQ (ng/L)	Ref.
1	PDMS	stainless steel rod	spin coating	direct and headspace	GC-MS	polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)	2.8-10.7	[37]
2	PDMS	stainless steel wire	polymerization	headspace	GC-MS	testosterone, epitestosterone	low ng/L	[65]
3	PDMS	membrane	polymerization	direct-immersion	Liquid chromatography (LC)-MS/MS	human skin gas	1	[66]
4	PDMS	PDMS	dipping	headspace	GC-MS	cocaine and methadone in human urine	500	[67]
5	SPME fiber	96-well deep plates	dipping	direct-immersion	GC-MS	nitrosamines	2.0-10.0	[68]
6	CAR/PDMS, PDMS/DVB	glass wool fabric mesh	sedimentation in solvent	direct-immersion	GC-toroidal ion trap mass spectrometry (TMS)	volatile and semivolatile organic compounds	hundreds of ppt levels	[69]
7	DVB/PDMS	carbon fiber mesh	polymerization	direct-immersion	high performance liquid chromatography (HPLC)	propazine and methacrylic acid	10,000	[70]
8	molecularly imprinted polymers	fused silica capillaries	polymerization	direct-immersion	LC-electrochemical detection system (ECD)	brombutol	3.69-69.4	[56]
9	graphene	stainless steel wire	dipping method	direct-immersion	GC-ECD	PAHs	1.52-2.72	[71]
10	graphene	stainless steel wire	dipping method	direct-immersion	GC-ECD	pyrethroid pesticide	18	[72]
11	graphene	silica fiber	layer-by-layer	headspace	X-ray fluorescence (TXRF)	methyl(cyclopentadienyl)-titanium	4.2-19.4 (nmol/L)	[73]
12	graphene	glass substrate	drop casting	headspace	HPLC	human exhaled breath condensate	5	[74]
13	polystyrene/graphene composite	filter paper	facile electrospraying	direct-immersion	GC	monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in seawater	3.6-8.6	[59]
14	single-walled carbon nanotubes	stainless steel wire	vapor deposition process	headspace	GC-ECD	polychlorinated diphenyl ethers	enrich organic matter	[75]
15	multiwalled carbon nanotubes	fused-silica fiber	dipping	direct-immersion	Aluminum foil	benz[a]pyrene and 1-hydroxypyrene in water and urine	50-150	[76]
16	polystyrene/oxidized carbon nanotubes	MALDI plate	dipping	direct-immersion	HPLC	benzodiazepines	LOQ 500	[77]
17	C18-coated porous silica particles	stainless steel	dipping	SPME-LC-MS/MS	LC-MS/MS	whole blood	LOQ 0.2 mg/L	[78]
18	C18-polyacrylonitrile	stainless steel	spraying	extracted blood	LC-MS/MS	whole blood	LOQ 1.0 mg/L	[79]
19	hydrophilic lipophilic balanced/polyacrylonitrile	polybutylene terephthalate	spraying	direct analysis in real time -MS/MS	LC-MS/MS	doping substances in biological matrices (urine, plasma, and whole blood)	100-1,000	[80]
20	poly acrylate-ethylene glycol	stainless steel blade	polymerization	direct-immersion	Fluorescence property	carvedilol	450	[81]
21	hydrophilic lipophilic balanced particles	polypropylene 96-well deep plates	dipping	direct-immersion	LC-MS/MS	in vivo and ex vivo saliva	LOQ 4-980	[82]
22	C18 blades	PVDF	dipping	direct-immersion	LC-MS	doping substances in urine	1,000-15,000	[83]
23	poly(vinylidene fluoride)	platinum wires	electrochemical deposition	direct-immersion	HPLC	benzoylurea insecticides	100	[84]
24	polypyrrole	glass fiber	UV-induced polymerization	headspace	GC-MS	VOCs standard reagents	0.12-0.15 (mg/mL)	[85]
25	poly(ethylene glycol) diacrylate	silica fibers	UV-induced polymerization	direct-immersion	High-speed liquid chromatography (UPLC)	parabens in cosmetic products	290 and 5,810	[86]
26	high porous sputtered silicon	polypropylene 96-well deep plate	sputtering	headspace	GC-MS	decanal and hexadecane	0.02 to 0.1 (mg/mL)	[87]
27	supraclean LC-WCX Silica particles	silica capillary tubing	dipping	direct-immersion	LC-MS/MS	rocuronium bromide and tranexamic acid in plasma	0.05-1.58 (ng/g)	[88]
28	ionic liquids	stainless steel wire	electroless plating technique	headspace	Cataluminescence (CTL) sensor	PAHs and phthalate esters	0.05-1.58 (ng/g)	[57]
29	silver-coated	stainless steel wire	dipping	direct-immersion	GC	triazole fungicides in fruit and vegetable	8.3-23.3	[89]
30	Metal Organic Framework (MOF-5)/graphene oxide	stainless steel wire	dipping	headspace	GC-FID Method	PAHs	12.0-15.4	[90]
31	MOFs-199	stainless steel wires	dipping	headspace	GC-MS	ethylhexylradol, bisphenol A, diethylstilbestrol and hexestrol in milk	170-560	[91]
32	MOFs protection/ionic liquids/PDMS	stainless steel fibers	cathodic electrodeposition	direct-immersion	HPLC	non-polar VOCs	6,000-60,000	[92]
33	MOFs-[E3NH]2/Zn3(BDC)4 (E-MOF-5)	stainless-steel fibers	hydrothermal growth	headspace	GC-MS	ammonium compounds	20-210	[93]
34	porous metal azolate framework	glass sheet	spraying	direct-immersion	LC-MS/MS	sulfur dioxide	100,000	[94]
35	zwitterionic detergent 3-[(3-cholanidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate	stainless steel wire	liquid phase deposition	headspace	Surface-enhanced Raman scattering (SERS)	non-polar benzene homologues	1,500-5,500	[95]
36	sea urchin-like ZnO nanomaterials	stainless steel wire	dipping	headspace	GC-MS	valproic acid in human serum	70,000	[96]
37	octadecyltrimethoxysilane/ZnO nanorods	stainless steel wire	dipping	headspace	GC-MS			[97]
38	Zn/AI layered double hydroxide/TiO ₂ composite	capillary glass rod.	sol-gel process	headspace	GC-MS			

その多くの抽出材料は、十分な VOC 検知感度に達していないことや材料合成にかかり、大量使用に適用しないこと、材料の吸着特性に依存し、抽出対象となる分子が限られることなどの問題が未解決である。液体サンプルと SPME のコーティングの間には、性能に大きな違いがある(**Figure 1.15**)。液体サンプル中の VOC 成分は、基本的に抽出相とマトリックスの界面にしか吸着されないことがわかる。抽出相に大きな経路がある場合は、VOCs がその経路の界面に吸着されるが、その拡散速度が遅い。一方で、抽出相が多孔質体の場合は、VOC 成分が迅速に細孔に拡散し、吸着が起こる。そのため、多孔質な抽出材料の開発がより高感度な SPME 分析にとって不可欠であることがわかる。

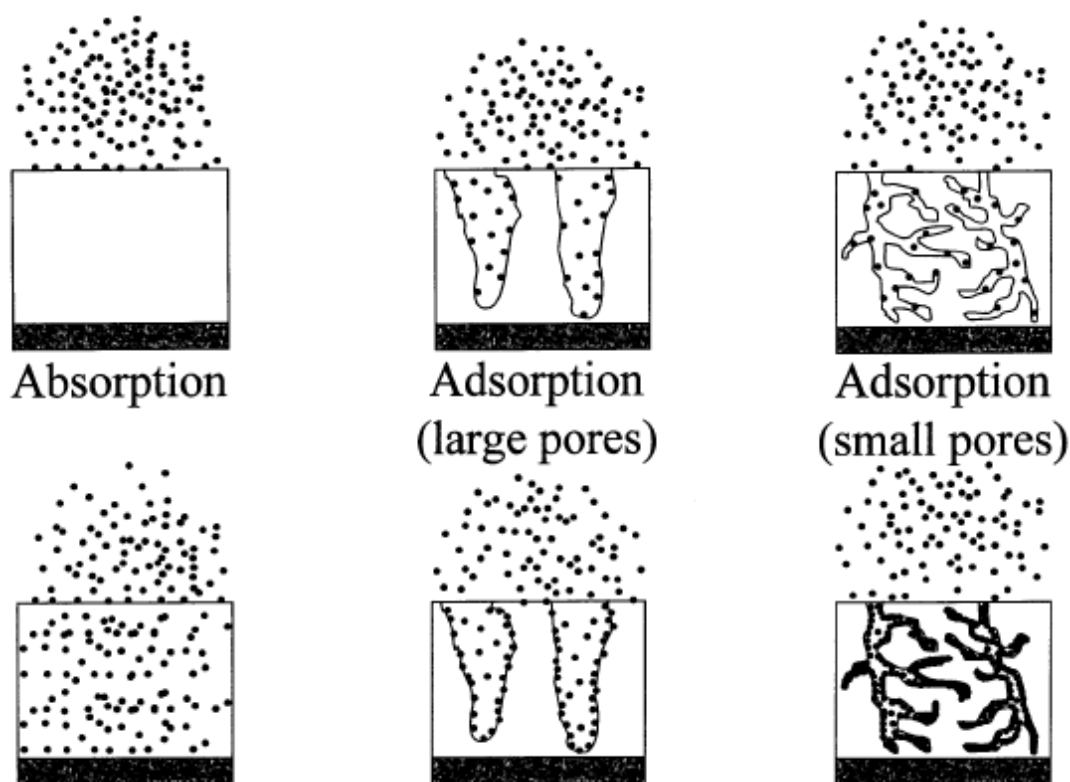


Figure 1.15. Schematic representation of absorptive versus adsorptive extraction and adsorption in small versus large pores.

感度を改善するための最良の選択肢は、高い表面積対体積比を有する薄い抽出相を使用することである[98]。多孔質材料は、その細孔サイズと構造の違いで分類される。細孔サイズに基づいて、マイクロ(細孔径が 2 nm 以下)、メソ細孔(細孔径が 2~50 nm)、マクロ細孔(細孔径が 50 nm 以上)に分類され、それぞれの代表的な物質は、ゼオライトの ZSM-5、メソポーラスシリカの MCM-41 およびスポンジが存在する。一方で、物質の構造に従って、無機、有機無機ハイブリッド、有機に分類され、代表的な物質は、シリカ、金属有機構造体(MOF)、多孔質ポリマーがある(**Figure 1.16**)。多孔質材料は、高い表面積、良好な多孔質構造、高い選択性などの利点を持つため、有機物の抽出、吸着および分離に応用されている。

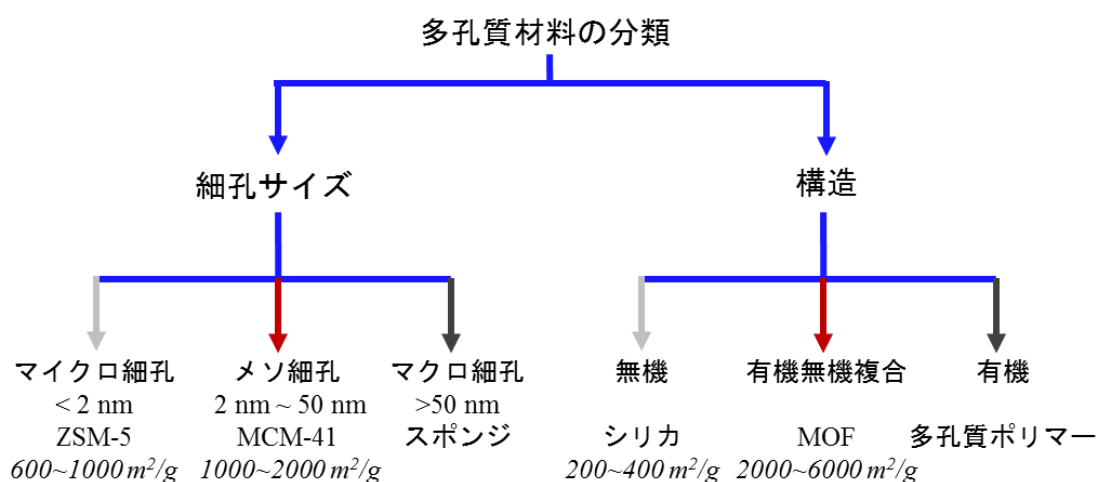


Figure 1.16. Classification of porous materials based on pore size and structure.

Figure 1.17 は、異なる無機材料の結晶構造および比表面積をまとめたものである。多孔質無機材料は、バルク粒子よりも高い比表面積を有する。ナノ粒子は、マイクロサイズ粒子よりも高い比表面積を示す。使用する材料の選択には、材料の本質的な特性、互換性、界面相互作用の形態、目的とするアプリケーションの望ましい特性および材

料準備を含めた全体的な材料費を考慮する必要がある。

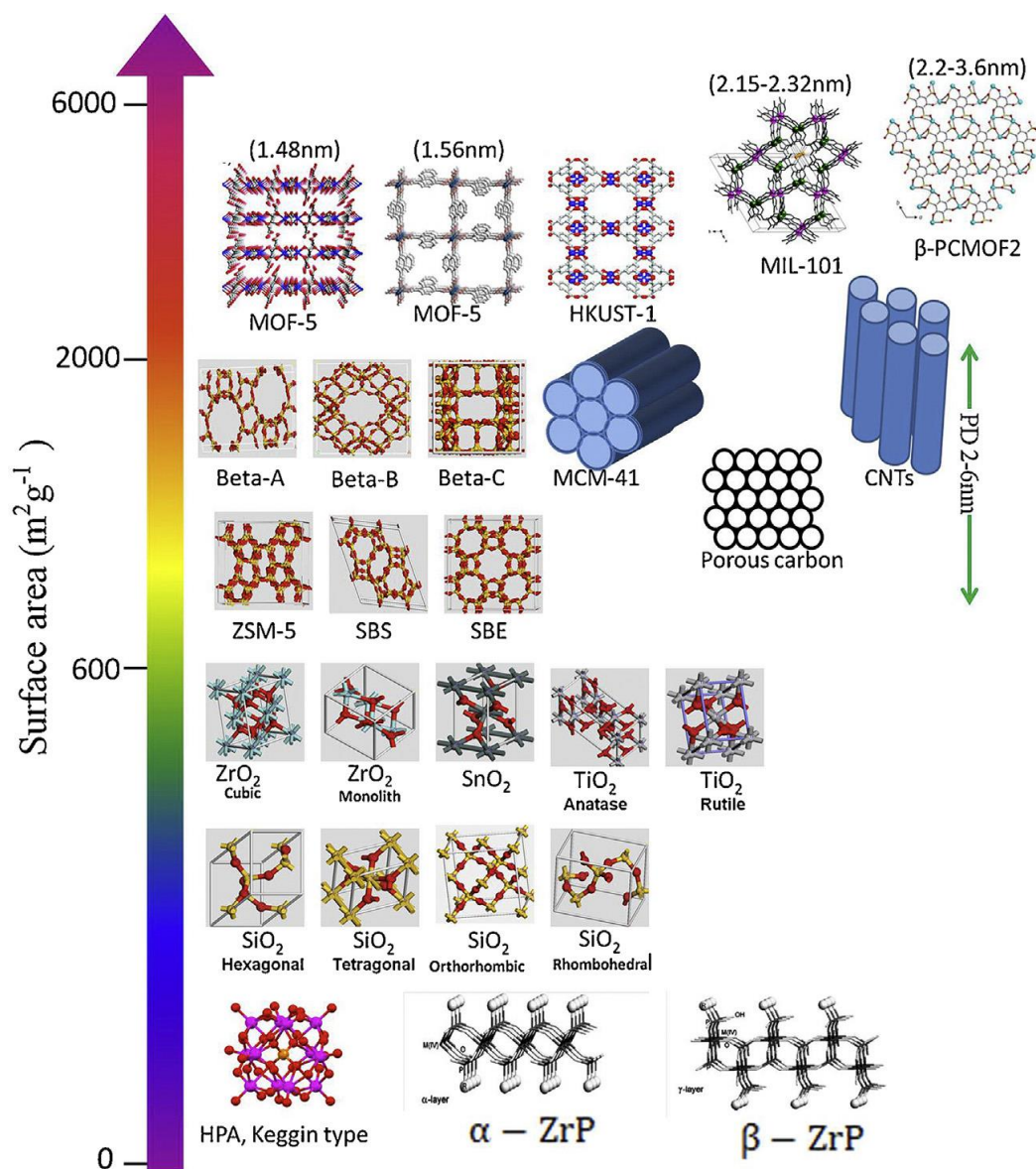


Figure 1.17. Crystal structures and specific surface area of different inorganic materials [99].

一般的に、ナノスケールの材料(サイズが 10~100 nm)は、バルク状材料(サイズが 2 mm 以上)より、水溶液中に存在する有機物の抽出、分離に相応しいため、多くの研究者たちに関心を持たれている。使用材料のサイズが小さくなるにつれ、材料の比表

面積が増加し、その吸着能力が著しく改善されることが実証されている[100] (**Figure 1.18a**)。歴史的には、活性炭は、従来のナノ多孔質材料であり、表面積が一般に $500\sim 1500\text{ m}^2\text{g}^{-1}$ である。高表面積、水性環境での高い安定性のため、様々な有機物の重要な吸着剤となっている。しかし、活性炭は、その細孔構造は乱れており、細孔の大部分は、 2 nm 以下で、大きな分子の吸着能力が低く、質量移動の平衡に達するために、物質移動速度が遅く、等価時間が長い問題点がある (**Figure 1.18b**)。

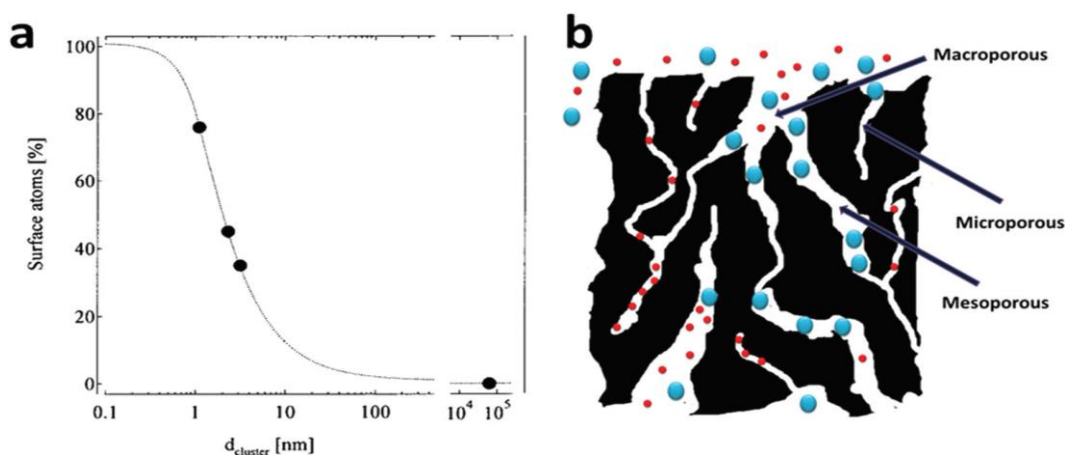


Figure 1.18. (a) The average percentage of surface atoms as a function of the nanoparticle diameter. Reprinted with permission from ref. 52. (b) A structural scheme for a typical activated carbon, which contains highly disordered macropores ($>50\text{ nm}$), mesopores ($2\sim 50\text{ nm}$) and micropores ($<2\text{ nm}$). The micropores contribute to a large part of its surface area, but are only available for the adsorption of small molecules and may be easily jammed by large molecules [100].

ゼオライトは、 2 nm より小さい規定された細孔を有する高シリカ結晶アルミノ珪酸塩の系列である。そのうち、ZSM-5 は、Mobil Oil Company によって最初に開発された。ZSM-5 ゼオライトは、工業的に重要な多くの有機分子のサイズに近い細孔開口 (約 0.5 nm) を有する独特のチャネル構造や高い表面積 ($600\sim 1000\text{ m}^2/\text{g}$) のため、過去 10

年間で最も研究されたゼオライトである[101]。したがって、ZSM-5 の細孔よりも小さいサイズの分子は、平衡保持してゼオライトに入り、吸着することができる。従って、ZSM-5 は、主な触媒用途に加え[102, 103]、複合混合物からアルコールを回収するため、およびガス分離のために、化学物質の選択的な吸着および濾過に使用することができる[104-106]。

Table 1.4. Comparison of zeolite/polymer composites for analytical purposes.

zeolite	polymer	analytes	purpose	ref
ZSM-5	Tenax TA	Headspace of VOCs	SPME for GC-MS	[107]
ZSM-5	PDMS	isopropyl alcohol, water	separation membrane	[108]
ZSM-5, Zeolite Y	PDMS	chlorinated hydrocarbons	filtration membrane	[109]
Zeolite 4A	PDMS	C ₃ H ₈ , CH ₄ , CO ₂ , H ₂	gas permeation experiments	[110]
ZSM-5	Sintered stainless steel fibers	toluene	toluene adsorption	[111]
ZSM-5	PDMS	chlorinated VOCs	filtration membrane	[112]
ZSM-5	Polyether block amide	aroma, ethyl acetate	aqueous solution by prvpaporation	[113]
ZSM-5	Non	trichloroethylene	SPME for GC-MS	[114]
Zeolitic imidazolate frameworks	Polyvinylamine	CO ₂ /N ₂ separation	gas seperation	[115]
Zeolite 4A	PDMS	hydrogen separation	gas seperation	[116]
ZSM-5	PDMS	alcohols, aromatic compounds	SPME for GC-MS	本研究

これまで、いくつかのタイプのゼオライト/ポリマー複合材料が、**Table 1.4** に列挙されているように、異なる分析目的のために試されてきた。例えば、ごく最近、Ramaiah らは、水溶液から有害な塩素化 VOCs を除去するために使用された ZSM-5 装荷層状ポリマー膜を使用した[88]。私が知る限りでは、ZSM-5 と Tenax-TA の複合薄膜は、水性媒

体からの有機溶媒の平衡に基づく抽出と予備濃縮のための抽出相として初めて使用された[89]。

1.4 本研究の目的

そこで本博士論文では、がんの早期発見および診断のための低分子代謝物の分子情報の解明に着目した。最初に、低分子代謝物を分析できる ZSM-5/PDMS 複合膜を開発し、ZSM-5/PDMS の薄膜マイクロ抽出法と GC-MS の組み合わせを利用した効率的な VOC 抽出方法の検討および生体 VOC 分析に必要な基盤技術の確立を行った。ヒトの血液中の低分子代謝物の解析は、最も効率低なメタボロームの解析手法であり、がんなどの疾患と直接に関連する VOC バイオマーカーの探索に役に立つ。次に、健常者 6 名の唾液および尿を連続的に分析し、ヒト唾液および尿中に存在する内因性 VOC 分子情報の解明に成功した。更に、口腔がん患者の唾液を分析し、グループの健常者データとの比較を行い、新規がんバイオマーカーの特定を実証した。ヒトの肺がん細胞と肺がん患者の肺正常細胞の培養を介して、肺がんの VOC バイオマーカーの探索を行った。ヒト体液と肺がん細胞から得られた低分子情報の比較を通じて信頼性が高い VOC バイオマーカーの特定を行った。そして、がん細胞(主に、ヒト子宮頸がん、肝臓がん)の培養を行い、がん細胞における分子代謝情報を解明し、多くのがん細胞の潜在的な VOC バイオマーカーを発見した。更に、細胞における分子移動の平衡によって、薬物や発見した潜在的な VOC バイオマーカーのがん細胞への投与を行い、異なるがん細胞の VOC 代謝結果を得られた。得られたデータを主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) や階層的クラスター (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) などの統計的分析を通じて、VOC バイオマーカーの信頼性を裏付けた。最後に、これまでに得られた疾患と関連する低分子代謝物の分子情報を背景に、長周期格子光ファイバー (Long Period Grating, LPG) や紫外可視近赤外分光

法 (UV-vis) の分析デバイスと高分子電解質、酸化チタン、機能性色素分子 (ポルフィリン)、金ナノ粒子などの材料の組み合わせによる新たな低分子代謝物の検出方法の開発を行った。

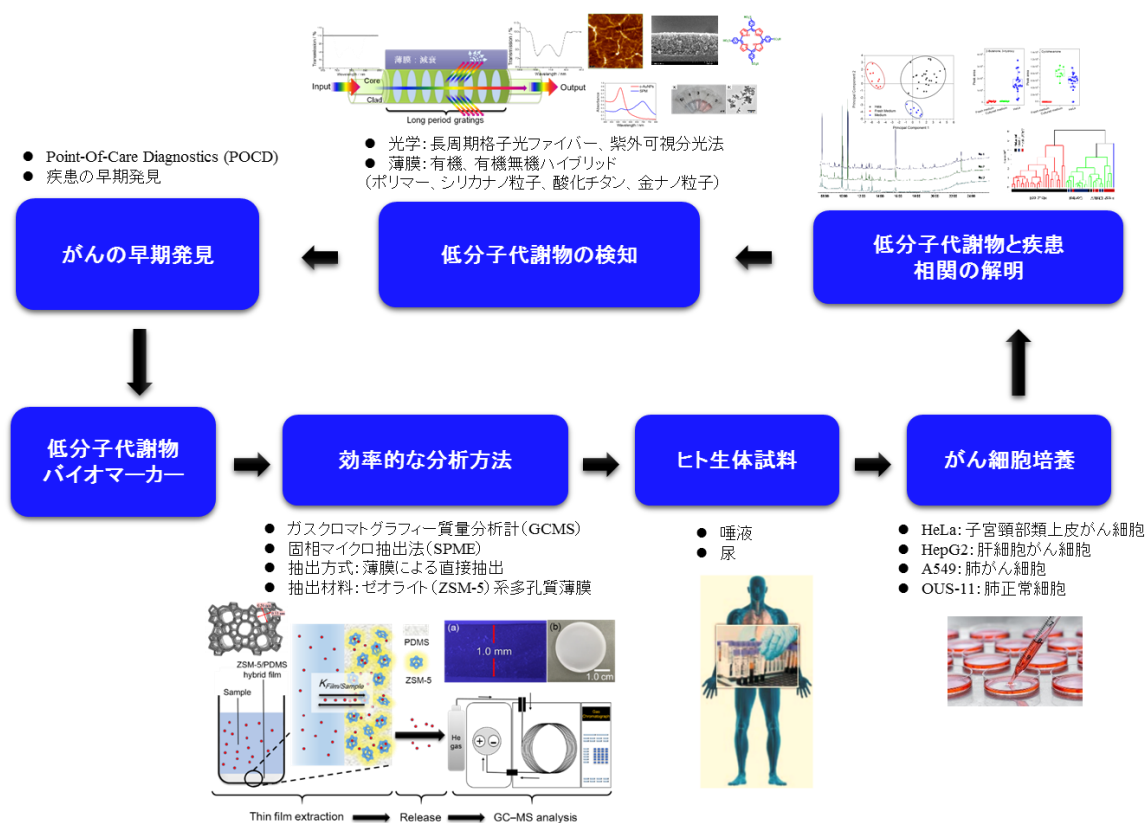


Figure 1.19. Research schematic of this PhD thesis.

第 2 章

効率的な VOC 抽出方法の検討および生体 VOC 分析に必要な基盤技術の確立

2.1 緒言

有機揮発性物質は、人体から放出される小分子代謝産物の中で、疾患、特にがんの早期検出および治療のためのバイオマーカーとして大きな可能性を秘めている[1]。したがって、血液サンプル、呼気またはがん細胞のヘッドスペース中のVOCsの検出、肺がん（LC）を診断するための新たなアプローチである[2,3]。呼吸サンプルは、がんだけでなく、呼気中のVOCsをプロファイリングすることによって検出できる他のタイプの疾患も診断するために調査されている[4]。例えば、酸化ストレスに由来するエタノールおよびペンタン、真性糖尿病およびケトン血症由来のアセトン、ならびに尿毒症および腎障害からのアンモニア、ジメチルアミンおよびトリメチルアミンなどの窒素含有化合物を含む[5]。

GC-MSに基づく分析法によって微量レベルで存在する検体を効果的に検出するために、通常、試料調製中に予備濃縮工程が必要である。SPMEは、最も広く使用されている試料調製技術であり、抽出、濃縮および試料導入の簡便な手法であり、従来の分析方法に比べていくつかの利点がある[6]。

SPME技術は、その開発以来、迅速で無溶媒で、比較的安価であり、環境、食品、薬物分析などの多くのアプリケーションにおいて応用されている[7,8,9]。SPMEは、コーティングの性質に応じて、試料マトリックス中の分析対象物と抽出相（コーティング）との相互作用に基づき、吸収または吸着を引き起こす[10]。SPMEの抽出選択性および効率は、被膜の物理的特性（すなわち、多孔性、比表面積およびサイズ）ならびに被分析物とのその相互作用（すなわち、その化学的特性）に大きく依存する。抽出感度は、抽出相の体積を増加させることによって改善することができる。しかしながら、より長い平衡時間（被検物質のコーティング材料への拡散によって駆動される）が必要である。

感度を改善するための最良の選択肢は、高い表面積対体積比を有する薄い抽

出相を使用することである[11]。この目的のために、SPME の最もよく知られている材料である PDMS と共に、微多孔質およびメソポーラス材料などの高多孔質構造を使用することができる[12,13]。ゼオライトは、2 nm より小さい細孔直径を有する高シリカ結晶アルミノ珪酸塩である。Mobil Oil Company によって最初に開発されたゼオライト ZSM-5 は、工業的に重要な多くの有機分子のサイズに近い細孔サイズを有する独特のチャンネル構造のため、過去 10 年間で最も研究されたゼオライトである[14]。したがって、ZSM-5 の細孔より小さいサイズの分子は、平衡保持しながら、ゼオライトに入り、吸着することができる。したがって、ZSM-5 は、触媒用途に広く適用され、例えば、複雑な混合物からのアルコールの回収[17]およびガス分離[18,19]のための選択的な吸着およびろ過に使用することができる。

最近、いくつかのタイプのゼオライト/ポリマー複合材料が水溶液からの有害化学物質の固相抽出に適用されている[20–22]。我々の以前の研究では、ZSM-5 と Tenax-TA の複合薄膜が水性媒質からの有機溶媒の平衡に基づく抽出および予備濃縮のための抽出相として用いられてきた[23]。本研究では、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜に基づく TFME 法を実証し、水性試料から有機揮発性物質の直接抽出を評価した。

2.2 実験項目

2.2.1 使用試薬

ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ モル比 = 30, Lot: 110421) と SAPO-34 ($\text{SiO}_2/\text{P}_2\text{O}_5/\text{Al}_2\text{O}_3 = 0.2 : 1 : 1$, Lot: HAH140811) は、JGC Catalysts and Chemicals Ltd から購入した。PDMS 溶液キット (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit) を Dow Corning Ltd から購入した。

ベース溶液(Sylgard 184A)と硬化剤溶液(184B)は 10:1 の比率で混合し、PDMS ポリマーを製造した。Methanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol および 1-dodecanol は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd から入手した。1-Propanol と 1-octanol は、それぞれ、Kanto Chemical Co., Inc と Nacalai Tesque, Inc から購入した。実験に用いた化合物は全て分析等級であり、更に精製することなく使用した。脱イオン純水(18.3 M Ω ·cm)はイオン交換および濾過(ミリポア、direct QTM)に続いて逆浸透によって得た。

2.2.2 ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜の作製

容量が 50 mL のガラスサンプル瓶を ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の支持体として使用した。PDMS モノマーに対して重量比が 10 および 20 wt%になるように ZSM-5 を加えて均一に混ぜ、1.0 g の混合試料をサンプル瓶の底に垂らし、室温で 3 日間静置し、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を硬化させた。更に、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を 100 °C の乾燥機の中で 1 時間熱処理を行った後、メタノールを振とうさせながら 3 日間複合膜の洗浄を行った。同様に ZSM-5 を添加していない PDMS 単体膜を作製して ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜との比較に用いた。20 wt% SAPO-34/PDMS 膜は、比較実験のために準備した。SAPO-34 は、CHA フレームワークを持ち、 $3.8 \times 3.8 \text{ \AA}$ の開口部を有する小孔のシリコアルミノホスフェートモレキュラーシーブである。

2.2.3 ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の特性評価

ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の形態観察は、電界放射型走査電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM, Hitachi S-5200, Japan)を用いて行った。ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の表面観察は、コンタクトモードで MicroMash NSC12/Ti-Pt/15 シリコンカンチレ

バー(曲率先端半径< 40 nm, tip length 15–20 μm)を介し、JSPM-5200 atomic force microscope (AFM), JEOL を用いて行った。

2.2.4 サンプルングと分析

水溶液サンプルの抽出は、マルチシェーカー(EYELA, FMS-1000, Tokyo Rikakikai, Co., Ltd).を用いてを 200 rpm で連続的に攪拌して行われた。抽出温度は、電子冷却サーモスタット浴(TB-1, BAS, Co., Ltd)を用いて制御した。同じ方法で作られた 3 つの異なる ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を使用して、膜と膜間の再現性研究を行った。PDMS マトリックス中の最適な ZSM-5 量は、1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, benzyl alcohol および phenol の水溶液(50mL, 10 $\mu\text{g/mL}$, 10 ppm)を用いて確認した。使用膜の総重量は、1.0 g であり、ZSM-5 の含有量は、0, 10, 20 wt%の三つであった。水溶液サンプルを ZSM-5/PDMS 複合膜ボトル瓶に入れ、3 時間、30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で振動かけて抽出を行った。抽出後、水溶液サンプルを捨て、水洗浄と窒素乾燥を行った。更に、VOCs の脱離は、メタノール(100 μL), 30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間振動かけて行った。最後に、メタノールサンプルを 1.0 μL 取り、GC に注入した。

20 wt% ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の最適抽出温度、時間条件は、12 種類の標準試薬の混合溶液(50 mL, 10 ppm)を用いて確認した。サンプルング時間は、3 時間で温度は、10, 20, 30 度で行った。メタノールによる VOCs の脱離は、脱離時間は 0 から 30 分であり、脱離温度は、10 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 離で行った。実サンプル抽出は、50 mL の市販ソフトドリンク(A:Otsuka Pharmaceutical, Japan. B:Coca-Cola, Japan)を用いた。20 wt%の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜は、市販の SPME ファイバーである poly(dimethylsiloxane)/divinylbenzene (PDMS/DVB) (65 μm) との比較に用いられた。SPME ファイバーは、50 mL の 12 種類の標準試薬

の混合溶液 1 ng/mL (1 ppb) に浸漬し、室温条件下で 3 時間抽出を行った。テフロン(Teflon)で被覆された攪拌子を用いて混合溶液を 1000 rpm で攪拌しながら抽出を行った。抽出後に SPME をバイアル管から取り出して、水で洗浄し、窒素ガスで乾燥した後、GC の注入口に挿入し、230 °C で 5 分間脱着した。

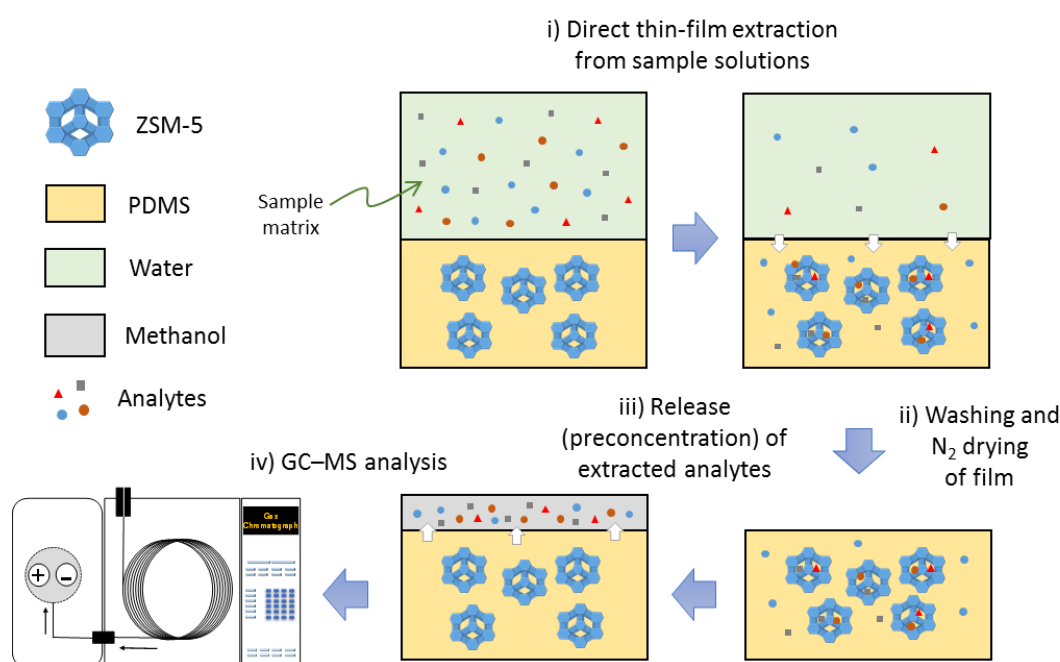


Figure 2.1. Schematic illustration of GC-MS analysis of organic volatiles via ZSM-5/PDMS hybrid-film extraction.

2.2.5 GC-MS 測定条件

GC-MS 測定は、それぞれ、JMS-Q1000GC (JEOL, Japan)と Agilent 7890A のを 70 eV 電子イオン化 (EI) モードで行った。GC-MS は JMS-Q1000GC(JEOL, Japan) を用いた。カラムは DB-WAX(ポリエチレングリコールベースの高極性固定相、内径 0.25 mm、吸着層厚み 0.5 μ m、長さ 30 m)を用いた。GC 注入口の温度は 230°C

でキャピラリーカラムの温度は 40 °C で 3 分間、10 °C/min で 230 °C まで昇温し、10 分間保持して測定した。キャリアガスは超高純度ヘリウムガス(純度 99.999%)を 1 mL/min の速度で流した。測定は Splitless モードで行った。MS 設定については動作条件が電子衝突イオン化モードで 70 eV とした。イオン源および GC インタフェースの温度はそれぞれ 200 °C および 230 °C に設定した。データ解析はフルスキャンモードで($m/z=25\sim310$)、スキャンタイム 0.3 秒で行った。同定は National Institute of Standards and Technology (NIST)マスペクトルライブラリーサーチ(JEOL version 1.5)ソフトウェアを用いた。

2.3 結果および考察

2.3.1 ZSM-5/PDMS 薄膜の特性評価

Figure 2.2 に示すように、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の形態的特徴は、SEM を用いて調べられた。PDMS のみの膜は、平らなマイクロメイン化された表面を示した(**Figure 2.2a**)。ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜に埋め込まれた ZSM-5 ゼオライトは、膜表面に観察された。20 wt% の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜(**Figure 2.2c**)は、低い充填率膜(10 wt%, **Figure 2.2b**)よりも ZSM-5 ゼオライトが高密度に分散していることがわかる。ZSM-5 の長方形のブロックは、20 wt% の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜 (**Figure 2.2d**) の断面 SEM 画像において明確に観察され、PDMS マトリックス中に 300~600 nm のサイズを有する ZSM-5 の凝集物が存在する (**Figure 2.2d** の挿入図)。ハイブリッド膜中の ZSM-5 粒子は、PDMS 層との良好な界面接触を示し、これは水溶液中での膜の良好な安定性を提供する。しかしながら、ZSM-5 の含有量が 20 wt% より高い場合、膜は不安定になるため、PDMS 膜中の ZSM-5 の最大含有量を 20 wt% までと固定した。その結果、水溶液

中の有機揮発性物質は、ZSM-5 の空洞を介して PDMS ハイブリッド薄膜の表面から内部に効率的に解離することができると考えられる。

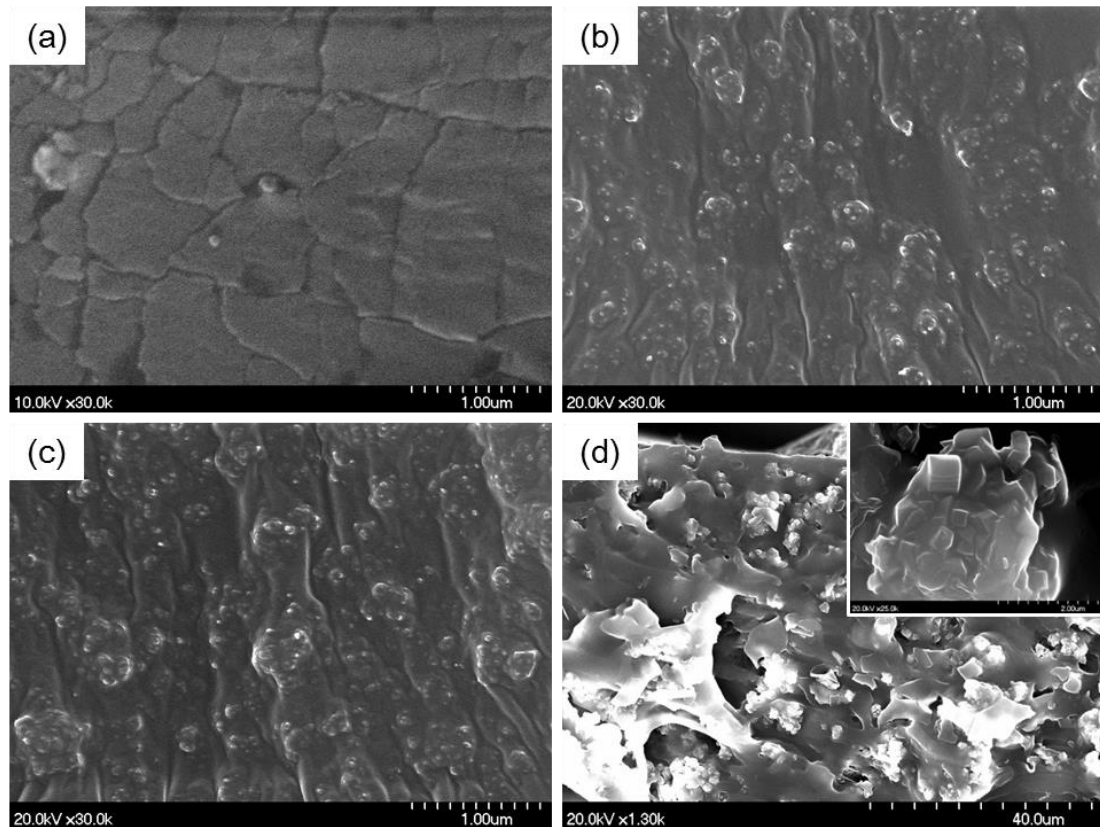


Figure 2.2. SEM surface images of (a) a PDMS film, and (b) 10 wt% and (c) 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films. (d) SEM cross-sectional view of c.

Figure 2.3 は、PDMS 膜、10 wt%ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜および 20 wt% ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の表面形態の AFM 画像を示す。PDMS 膜 (**Figure 2.3**) の表面平均粗さは、約 1.6nm であり、比較的均一で滑らかな表面を示した。これは SEM (**Figure 2.3a**) の結果とよく一致する。10 wt% の ZSM-5/PDMS (**Figure 2.3c**) および 20wt% の ZSM-5/PDMS (**Figure 2.3e**) ハイブリッド膜の表面に、ZSM-5 ゼオライトの長方形のブロックが観察される。更に、10 wt% の ZSM-

5/PDMS ハイブリッド膜および 20 wt% の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の表面平均粗さは、12.9 および 27.4 nm であった。

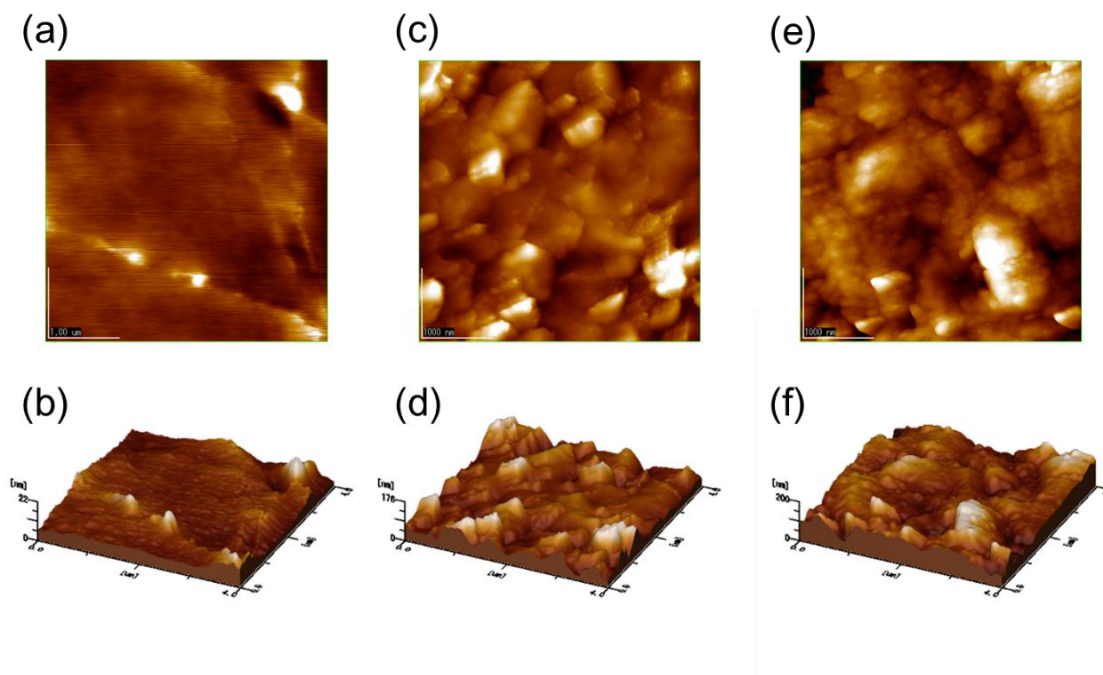


Figure 2.3. AFM images of (a, b) a PDMS film, and (c, d) 10 wt% and (e, f) 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

2.3.2 VOC 抽出の感度に対する PDMS 中のゼオライト含量の影響

最も一般的なエラストマーの一つである PDMS は、水溶液からの有機物の分離または抽出のための吸着材料として広く利用されている。しかし、PDMS ポリマーの疎水性が高いため親水性化合物の吸着には適用しない。PDMS の VOCs に対する抽出および分離性能を改善するために、ZSM-5 ゼオライトの PDMS ポリマーマトリックスへの取り込みが探究されている。ZSM-5 ゼオライトの分子ふるい分け作用、選択的吸着および拡散速度などの利点が期待できる。本研究では、PDMS 膜および PDMS ベースのハイブリッド膜を 10 および 20 wt% の ZSM-5 含有量で製造し、GC-MS 測定に使用した。しかしながら、**Figure 2.S1** に示すよう

に、調製した直後の膜は、ポリマーの重合に参加していないシロキサンの不純物の高いピーク強度シグナル (m/z : 73, 207) が質量スペクトルから観察できる。これらのピークは、標的分析物の質量スペクトルと干渉し、NIST データベースを用いて同定することが困難になる。従って、膜は、GC-MS クロマトグラムから不純物が消失するまで、使用前にメタノールで十分に洗浄した。**Figure 2.S1** からわかるように、シロキサンピークの大部分は、メタノールによる 3 日間の洗浄後に有意に減少した。

ハイブリッド膜の ZSM-5 含量は、抽出相の特性に著しく影響する。ここで、水溶液から VOCs を抽出するために、3 種類の膜 (PDMS、10 wt%ZSM-5/PDMS および 20 wt%ZSM-5/PDMS) を使用した。3 つの代表化合物(1-pentanol, 1-octanol, and benzyl alcohol)の水溶液から 30°C で 3 時間抽出後のスキャンモードで得られた全イオンクロマトグラム (TIC) を **Figure 2.S2** に示した。第一級アルコールおよびベンジルアルコールのイオン番号が 31 と 79 である[30]。この研究で用いた標準分子の物理化学的性質を **Table 2.S1** に示す。3 時間の抽出時間で十分な分析感度が得られたが、VOCs の吸着は、その時点で平衡に達しなかった (データは示されていない)。脱離時間および温度は、それぞれ 30 分間および 30°C であった。

VOCs のピーク面積とゼオライト含有量との関係を **Figure 2.4a** に示す。すべての分析物について、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜による抽出は、PDMS 膜による抽出よりも効果的であった。10 wt% の ZSM-5 を PDMS に組み込むと、脂肪族アルコールの抽出が著しく改善された。しかし、ZSM-5 含有量を 20 wt% まで増加させると、有意な改善は生じなかった。

逆に、芳香族化合物 (ベンジルアルコールおよびフェノール) の抽出効率は、ZSM-5 含有量を 0~20 wt% に増加させると改善が見られた。これらの差異は、

PDMS と ZSM-5 の内部および表面の被分析物の異なる化学平衡に起因する可能性がある。脂肪族アルコールが PDMS から直ちに ZSM-5 ゼオライトに移動することは妥当である。芳香族化合物は、ZSM-5 と PDMS との高い親和性のために、PDMS マトリックスにおいてその拡散が遅い。結果として、膜中の ZSM-5 含量が高いほど芳香族化合物の吸着と抽出がより効率的になる。

2.3.3 抽出条件と脱離条件の最適化

温度は、分析物の抽出および脱離の効率、特に TFME における拡散制御吸着のための重要なパラメーターである。本研究では、最適温度を確認するために 10℃～30℃の 3 つの抽出温度を調べた。**Figure 2.S3a** に示したように、検討した検体の絶対ピーク面積は、20℃で 10℃よりもはるかに大きく、30℃でほぼ飽和している。1-pentanol, 1-octanol および benzyl alcohol の相対抽出効率を **Figure 2.4b** に示し、20 wt% の ZSM-5 / PDMS ハイブリッドフィルムが選択した化合物について 10～30℃の範囲で非常に類似した抽出挙動を示した。

Figure 2.S3b は、20 wt% ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜によって抽出された分析物 (1-pentanol, 1-octanol, benzyl alcohol) を 10℃、20℃および 30℃の脱離温度で 30 分間脱離させ、スキャンモードで得られた TIC を示した。VOC のピーク面積と脱離温度との間の関係を 3 つの代表化合物 (1-pentanol, 1-octanol, and benzyl alcohol) を用いて **Figure 2.4c** に示す。分析物は 10℃～30℃の放出温度下で反対の傾向を示すが、放出温度は VOCs の抽出効率に大きな影響を与えない。従って、最適な脱離時間を 30℃に設定した。異なる抽出 (**Figure 2.4b**) および脱離条件 (**Figure 2.4c**) での抽出効率を比較した場合、吸着した VOCs の脱離過程でマルチシェーカーを用いて 200 rpm で 30 分間連続的に攪拌した場合、抽出効率の低下が見られた。したがって、メタノールによる VOCs の脱離操作は、抽出

瓶を静置した条件で行われた。20 wt%の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜からの各分析物(1-pentanol, 1-octanol および benzyl alcohol)の脱離は、非常に速く、30 分以内に飽和に達した (**Figure 2.4d**)。従って、十分な分析感度を提供することを考慮し、30 分の脱離時間を採用した。

主成分分析 (PCA) を用いて、異なる抽出条件および脱離条件から得られた VOCs の抽出効率を解釈し、比較した。3 つの抽出温度および短い脱離時間(1 と 5 分)のデータは、負の PC1 スコアを持つことがわかる (**Figure 2.4e**)。一方で、3 つの脱離温度および長い脱離時間のデータは、正の PC1 スコアを示した。脱離操作 (攪拌の有無によって) が VOCs の抽出効率に大きな影響を与えたことを示している。3 つの脱離温度サンプルは、ほぼ等しい PC1 スコアを示し、脱離温度が VOCs の抽出効率に有意に影響しないことを示唆している。脱離時間の PC1 スコアは、脱離時間の増加に伴って正の方向にシフトした。それは、抽出効率の向上によるものである。それらの傾向は、**Figure 2.4c,d** の結果と一致している。ZSM-5/PDMS 薄膜抽出を用いた VOC 分析の最適抽出および脱離条件は、PCA によって客観的に評価された。

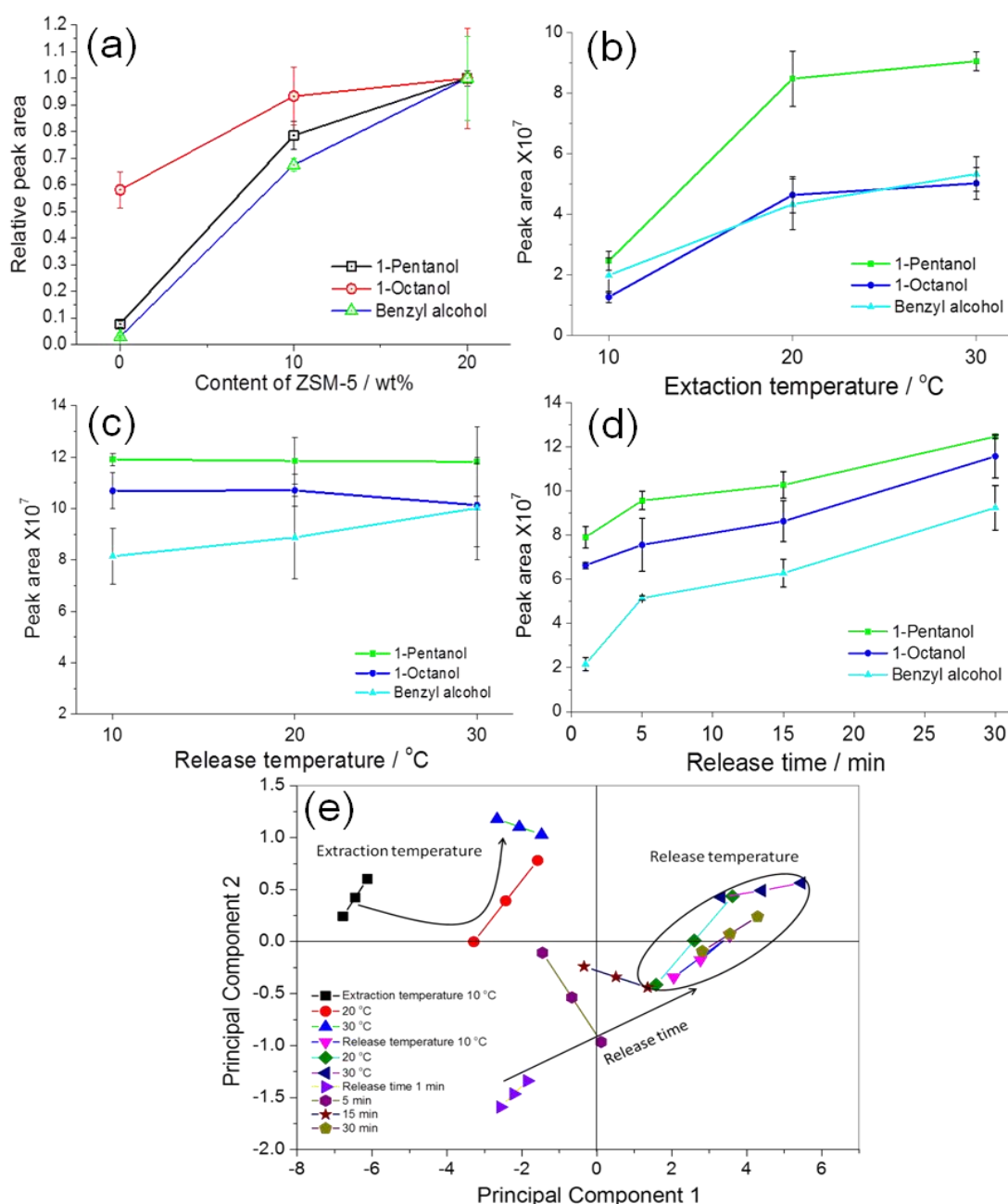


Figure 2.4. (a) Relationship between the peak areas of the selected three analytes and the zeolite contents in the films. Influence of (b) extraction temperatures, (c) release temperatures and (d) release time of the selected three analytes on the 20 wt% ZSM-5/PDMS thin film extraction. (e) PCA plots comparing extraction efficiency of all VOCs under different extraction and release conditions. Extraction conditions: sample volume 50 mL, concentration 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 ppm) for each compound, incubation time 3 h, (a) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release continuously agitated at 200 rpm for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$, (b) release: continuously agitated at 200 rpm for 30 min at 30 $^{\circ}\text{C}$, (c) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release: left standing for 30 min and (d) extraction temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, release: left standing at 30 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.4 水性サンプル中の VOC 抽出に及ぼすゼオライトの影響

水溶液中での VOC 抽出に及ぼすゼオライトの影響を調べるために、異なる細孔径 (ZSM-5 および SAPO-34) の 2 種類のゼオライトを選択した。20 wt% ZSM-5/PDMS と 20 wt% SAPO-34/PDMS 膜は、単一成分の PDMS 膜と比較した。

Figure 2.5 は、4 つの異なる膜を使用して水溶液中の VOCs の抽出で得られた GC-MS ピーク領域を示す。長鎖脂肪族アルコール(1-undecanol、1-dodecanol) のピーク面積は、PDMS 膜が最も高いが、短鎖アルコールおよび芳香族化合物に対して低い選択性を示す。これは、PDMS 膜が PDMS ポリマーとの長鎖脂肪族アルコールとの疎水性相互作用に起因し、1-undecanol と 1-dodecanol の濃縮に有効であることを示している。対照的に、SAPO-34 膜は、疎水性の高い化合物に対して比較的高い抽出効率を示す。SAPO-34/PDMS ハイブリッド膜の抽出効率は、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の抽出効率よりも低く、より大きな細孔直径が VOCs の抽出に有意な効果を有することを示唆している。ハイブリッド膜の抽出効率は、ゼオライトの細孔直径および Si/Al 比によって影響される。SAPO-34 の $\text{Si}/(\text{Si} + \text{Al} + \text{P})$ 比は、ZSM-5 の $\text{Al}/(\text{Si} + \text{Al})$ 比の 2 倍であることに基づく [31]。SAPO-34 は、Al 含有量が低く、電荷を触媒表面に吸収させることが困難であり、結果として疎水性が増大する。水溶液中に存在するアルコール分子に対する反発力は、ZSM-5 が弱いため、分子の吸着が起こりやすい。SAPO-34 の細孔直径は、ZSM-5 の約半分であるため、その分子ふるい機能が分子の大きさの影響を受ける。なぜなら、ゼオライトは、細孔直径より大きな分子を輸送することができないからである [31]。膜の厚さの増加は、検討した検体の抽出を改善することも示された。

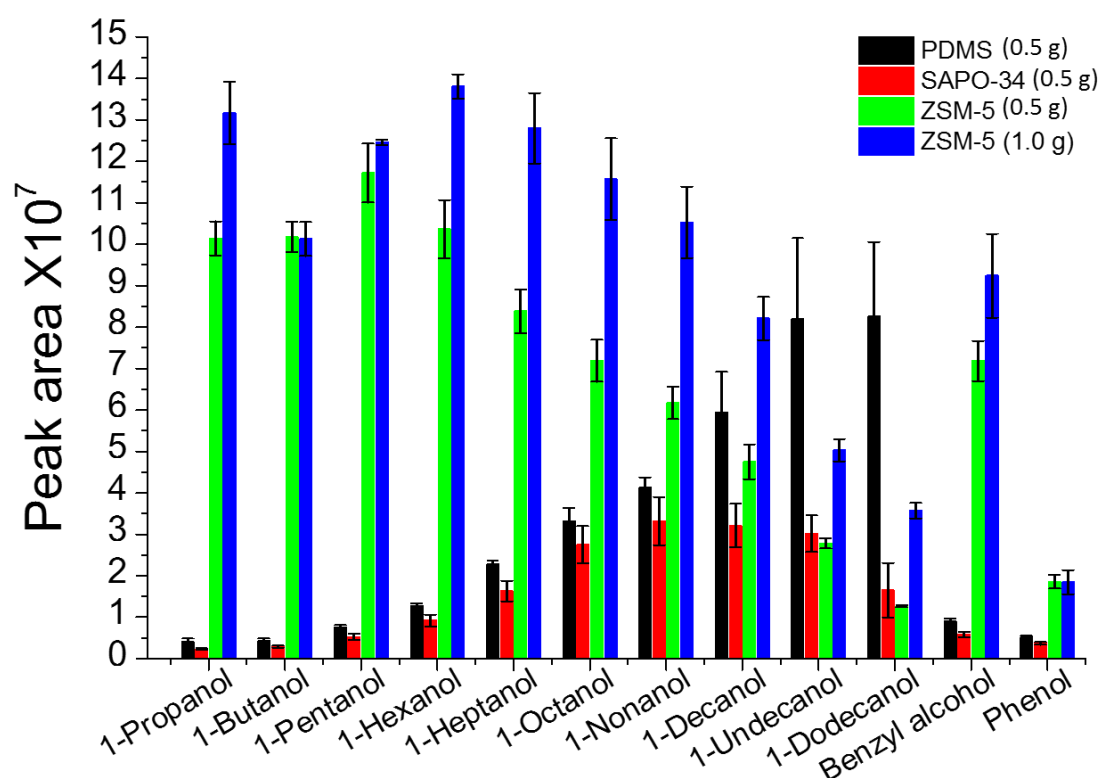


Figure 2.5. Comparison of extraction efficiencies of the PDMS (0.5 g), 20 wt% SAPO-34/PDMS (0.5 g), 20 wt% ZSM-5/PDMS (0.5 g), and 20 wt% ZSM-5/PDMS (1.0 g) films with peak areas of analytes.

2.3.5 水中 VOC 分析における ZSM-5/PDMS 薄膜の抽出特性評価

最適抽出条件が決定された後、水中の 12 種類の VOCs に対する GC ピーク面積の較正が行われた。濃度範囲内の全ての調査対象検体について濃度(1.0 pg/L–1.0 ng/mL, **Figure 2.S4**)に対する線形依存性が観察された。最適化された条件下での 20 wt%ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を用いた各分析物に対する提案された TFME—GC-MS 法の検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) を **Table 2.1** に示す。所与の濃度範囲において、全ての検体について 0.98 より高い良好な相関係数 (R^2) を有する直線性がわかる。すべての検体について得られた LOD は、応答の標準偏差と検量線の傾き比率の 3.3 倍 ($3.3\sigma/s$) に基づき、0.0034~0.049 $\mu\text{g/L}$

(ppb)の範囲にあり、LOQ は、応答の標準偏差と検量線の傾き比率の 10 倍 ($10\sigma/s$) に基づき、 $0.010\sim 0.15\ \mu\text{g/L}$ (ppb)の範囲内である。同じ膜の膜内再現性および同じ手順で作られた膜の膜間再現性は、それぞれ、2.4%から 13.4%および 4.2%から 12.4%の範囲であった。これらの値は、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の良好な性能を裏付けている。

Table 2.1. LODs and LOQs for individual analytes obtained from the GC–MS analysis using 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

Analyte	Selected ion (m/z)	LOD ^a ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ^a ($\mu\text{g/L}$)	Intra-film RSD% ($n = 3$)	Inter-film RSD% ^b ($n = 3$)	% Recovery (RSD%) ^b ($n = 3$)
1-Propanol	31	0.013	0.039	5.2	8.6	2.1 (0.2)
1-Butanol	31	0.010	0.031	3.9	6.6	11.8 (1.4)
1-Pentanol	31	0.0096	0.029	2.4	4.2	23.0 (1.4)
1-Hexanol	31	0.0055	0.017	3.7	6.4	57.3 (2.7)
1-Heptanol	31	0.0034	0.010	6.5	8.6	92.7 (5.6)
1-Octanol	31	0.0061	0.018	8.0	9.3	94.7 (6.7)
1-Nonanol	31	0.0062	0.019	7.6	9.3	96.6 (9.1)
1-Decanol	31	0.0035	0.010	7.1	9.2	105.3 (8.1)
1-Undecanol	31	0.0072	0.022	5.0	9.6	99.7 (11.6)
1-Dodecanol	31	0.0098	0.030	4.2	12.4	77.6 (14.9)
Benzyl alcohol	79	0.010	0.031	9.5	9.2	2.7 (0.2)
Phenol	66	0.049	0.15	13.4	11.9	1.7 (0.1)

^a LOD = $3.3\ \sigma/s$, LOQ = $10\ \sigma/s$,

σ は応答の標準偏差であり、 s は校正曲線の傾きである。

^b 同じ方法で調製した 3 つの 20wt%ZSM-5/PDMS 複合膜を用いて膜間再現性を得た。

一般的に、アッセイにおける検体の回収率は、サンプルマトリックスから抽出された検体の相対量から得られ、その回収率 (%) は、サンプルの精製において化学反応が起こらない場合に使用される。この研究では、個々の分析物の R 値は、以下の式 (1) から計算された。

$$R (\%) = (N_{AE} / N_{BE}) \times 100 \quad (1)$$

ここで、 N_{AE} は、サンプルマトリックスからメタノール 100 μ L に回収された分析物の量であり、 N_{BE} は、12 標準化合物を含有する 50 mL 標準水溶液中の分析物の量である（各成分 1.0 ppm, **Figure 2.S5**）。AE および BE はそれぞれ抽出後および抽出前のピーク面積である。20 wt%ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜から抽出された分析物の濃度は、膜抽出と混合標準溶液（メタノール中の各成分 1.0ppm、**Figure 2.S6**）中の分析物の直接 GC-MS 測定から得られたピーク面積の比較によって近似的に計算した。1-heptanol、1-octanol、1-nonanol、1-decanol、1-undecanol の回収率は、それぞれ、92.7%、94.7%、96.6%、105.3%、99.7%であり、より分子量が大きい脂肪族アルコール（C7-C11）は、90%程度の高い回収率を示した。しかし、ベンジルアルコールおよびフェノールの回収率は、3%未満であった。興味深いことに、1-hexanol（C6）と 1-heptanol（C7）の回収率は、それらの分子サイズのわずかな差にもかかわらず、それぞれ 57.3%と 92.7%であった。これらの結果は、両方の膜成分の異なる吸着特性の組み合わせによって、VOCs の選択的かつ敏感な吸着が達成され得ることを示している。

20 wt%の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を市販の 65 mm PDMS/DVB-SPME と比較した。ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜は、1-undecanol, 1-dodecanol および phenol を除いて、研究された全ての分析物に対して高い抽出効率を示した (**Figure 2.6**)。したがって、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜は、より小さな分子に対して優れた抽出能力を示す。ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の優れた抽出性能は、ゼオライトの細孔構造、より大きな表面積およびより大きい抽出体積に起因する可能性がある。

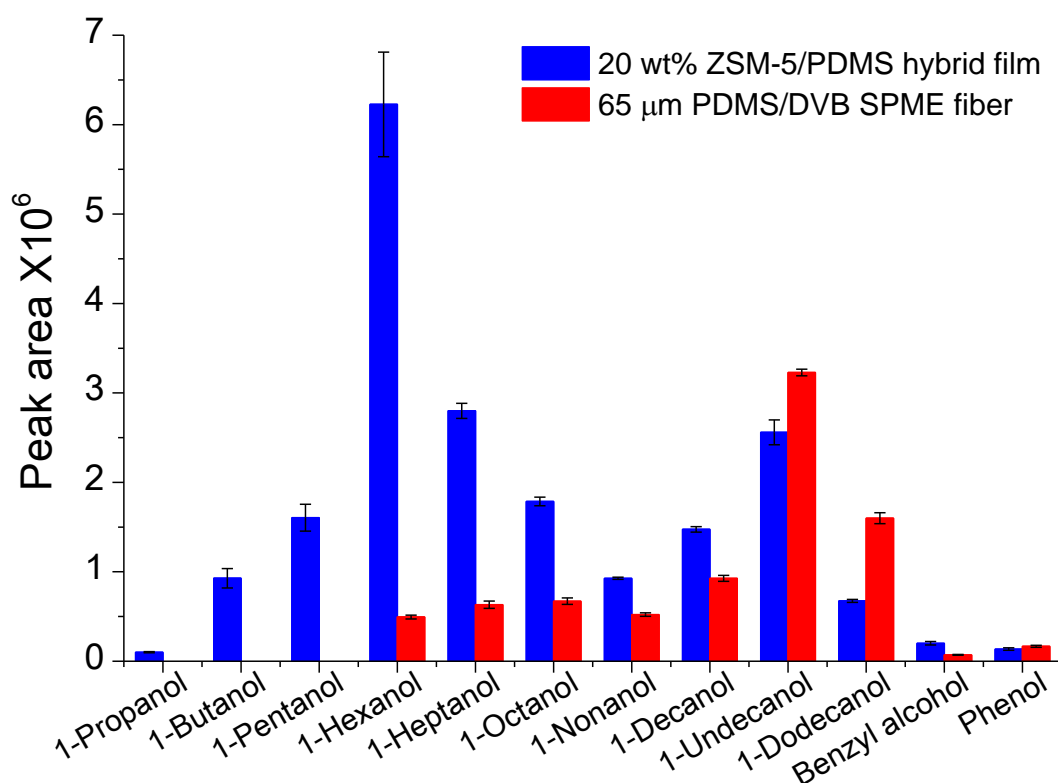


Figure 2.6. Comparison of the extraction efficiencies of the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film and the commercial 65 μm PDMS/DVB SPME fiber. The concentration of each analyte is 1.0 ng/mL (1.0 ppb). TFME sampling conditions ($n = 3$): sample volume 50 mL, temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, incubation time 3 h, release temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, and release time 30 min. SPME sampling conditions ($n = 3$): sample volume 50 mL, room temperature, incubation time 3 h.

2.3.6 実サンプルへの応用

最後に、20 wt%の ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を用いた市販のソフトドリンクの VOC 分析方法の有用性について検討した。2つの市販のソフトドリンク (A および B) を近くのコンビニエンスストアから入手し、上記の結果から得られた最適条件に従って抽出実験を行った。ソフトドリンク A および B では、GC-MS 測定によって合計 57 および 62 の VOCs が同定された (Table. 2.S2)。ソフトドリンクの典型的な全イオンクロマトグラムを Figure 2.S6 に示す。VOCs の同定

は、NIST マススペクトルライブラリ検索ソフトウェア (JEOL バージョン 1.5) によって達成され、70%を超える類似性値を有する化合物のみが採用した。d-リモネン(*d*-Limonene)、 α -テルピネオール(α -terpineol)、メントール(menthol)およびノトケトン(nootkatone)は、ソフトドリンク A において最も豊富であった。逆に、d-リモネン(*d*-limonene)、 α -テルピネオール(α -terpineol)、オイゲノール(eugenol)、オクタナール(octanal)、1-オクタノール(1-octanol)およびノトケトン(nootkatone)は、ソフトドリンク B において最も豊富であった。したがって、本手法は、2つのソフトドリンクサンプル中の共通成分と非共通成分とを区別することができる。これらの化合物のうち、オイゲノール、d-リモネン、 α -テルピネオールおよびノトケトン、特徴的なフルーティーな香りを有し、必須の油成分である。メントールは、多くのミントの練り歯磨きや歯茎に含まれているペパーミントの香味であり、医薬品にも使用されている。さらに、多くのテルペン化合物は清涼飲料水中でも検出され、植物の必須の油成分である。それらは、香水、抗菌薬、抗ウイルス薬の原材料として使用されている。以上の分析結果から、本手法は、水溶液中の VOCs の分析および類似した試料中の VOCs のパターン認識に有効であることを示している。

2.4 結論

本研究では、ZSM-5/PDMSハイブリッド膜による抽出とGC-MS法を組み合わせた新しいVOC抽出法を提案した。この新しいVOC抽出技術は、水溶液からシリーズの脂肪族アルコールおよび2つの芳香族化合物を効率的に抽出することが示された。最適な抽出条件を確認するために、抽出時間および温度などの抽出パラメーターを調べた。ZSM-5の充填率は、ZSM-5の含有量を0から20 wt%まで増加させることによって調べられ、20 wt%のZSM-5/PDMSハイブリッド膜が最

も高い抽出効率を示した。更に、ZSM-5/PDMSハイブリッド膜は、より小さい細孔直径を有する同様の量のSAPO-34ゼオライトを充填した膜よりも広い範囲の分析物に対してより高い抽出能力を有することが示された。ZSM-5/PDMSハイブリッド膜とGC-MSの併用法を用いたVOCsの直接TFME抽出法の利点は、試料量減少、高感度、サンプリング環境に対する高い抵抗性、高い抽出効率および大きな抽出体積などを含む。ZSM-5/PDMSハイブリッド膜は、市販の65 μm PDMS/DVB—SPMEファイバーよりも優れた抽出性能を示した。このアプローチの実用性は、市販の清涼飲料水のVOC分析によって実証された。また、ZSM-5/PDMSハイブリッド膜を利用したVOC分析法は、食品や環境分析、バイオテクノロジーなどの他の研究分野にも容易に適用できる高い可能性を秘めている。

2.5 補足資料

Table 2.S1. Physico-chemical characteristics of analytes used for this study.

Compounds	Boiling Point (°C)	Density (g/mL)	Water Solubility (g/L)	Retention Time (min)	Molecular Ion m/z
1-Propanol	97	0.896	soluble	7:36	31
1-Butanol	118	0.810	80 (20 °C)	9:09	31
1-Pentanol	136	0.811	22 (22 °C)	10:35	31
1-Hexanol	156	0.820	6 (25 °C)	11:59	31
1-Heptanol	176	0.822	2.85 (20 °C)	13:22	31
1-Octanol	196	0.827	insoluble	14:42	31
1-Nonanol	215	0.827	1 (20 °C)	15:59	31
1-Decanol	231	0.820	insoluble	17:11	31
1-Undecanol	242	0.830	0.004 (25 °C)	18:22	31
1-Dodecanol	260	0.833	insoluble	19:28	31
Benzyl alcohol	205	1.045	soluble	18:37	79
Phenol	182	1.071	0.8 (25 °C)	19:55	66

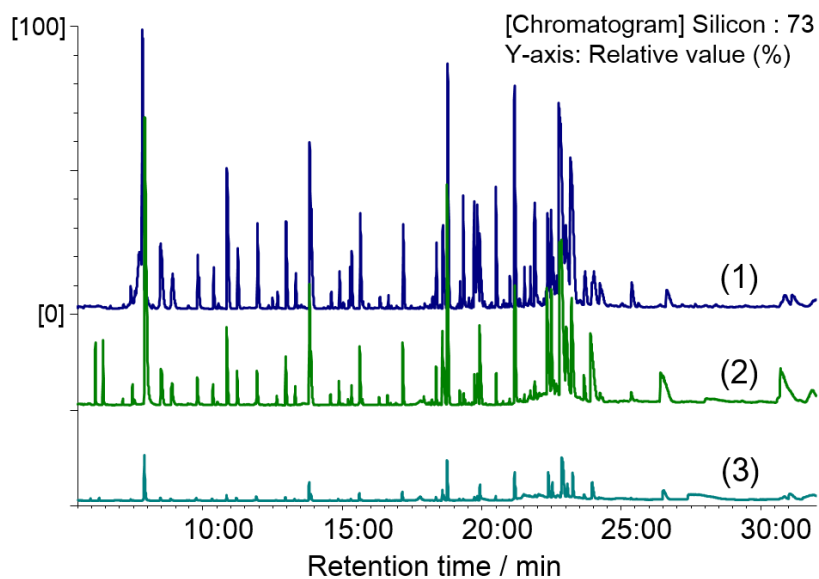


Figure 2.S1. Total ion chromatograms of the as-prepared hybrid film with a with 20 wt% ZSM-5 content. Signals with high peak intensities in the mass spectra are attributable to contamination by siloxane bleed (m/z 73, 207), which significantly decrease after methanol rinsing for: (1) 1 day, (2) 2 days, and (3) 3 days.

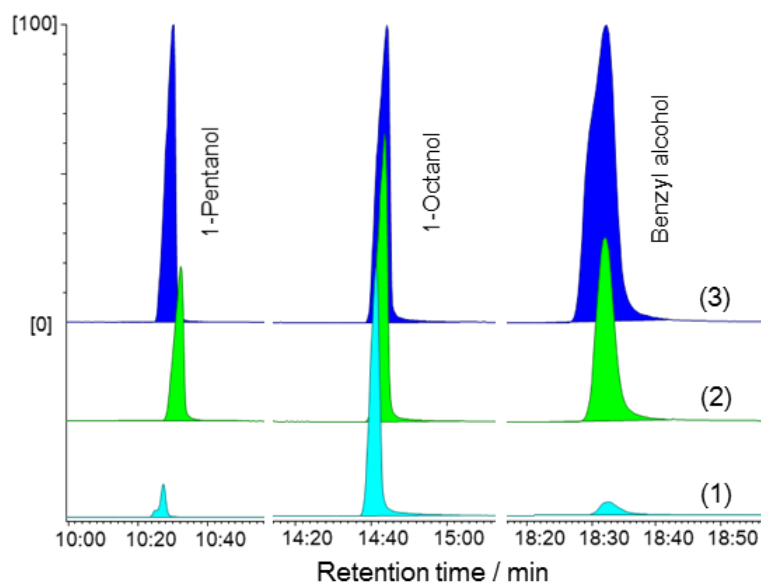


Figure 2.S2. Reconstructed chromatograms for 1-pentanol, 1-octanol, and benzyl alcohol extracted from the (1) PDMS film, and the (2) 10 wt% and (3) 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid films.

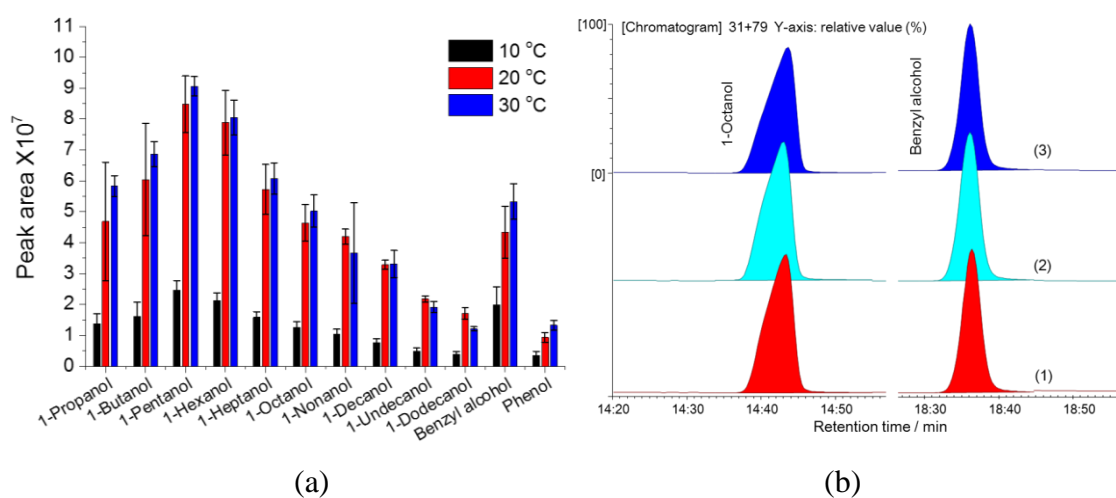


Figure 2.S3. (a) Comparison of extraction efficiencies of the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film with peak areas of analytes under different extraction temperature conditions. (b) Reconstructed chromatograms for 1-octanol and benzyl alcohol extracted from the 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film under different release temperature conditions; (1) 30 °C, (2) 20 °C and 10 °C.

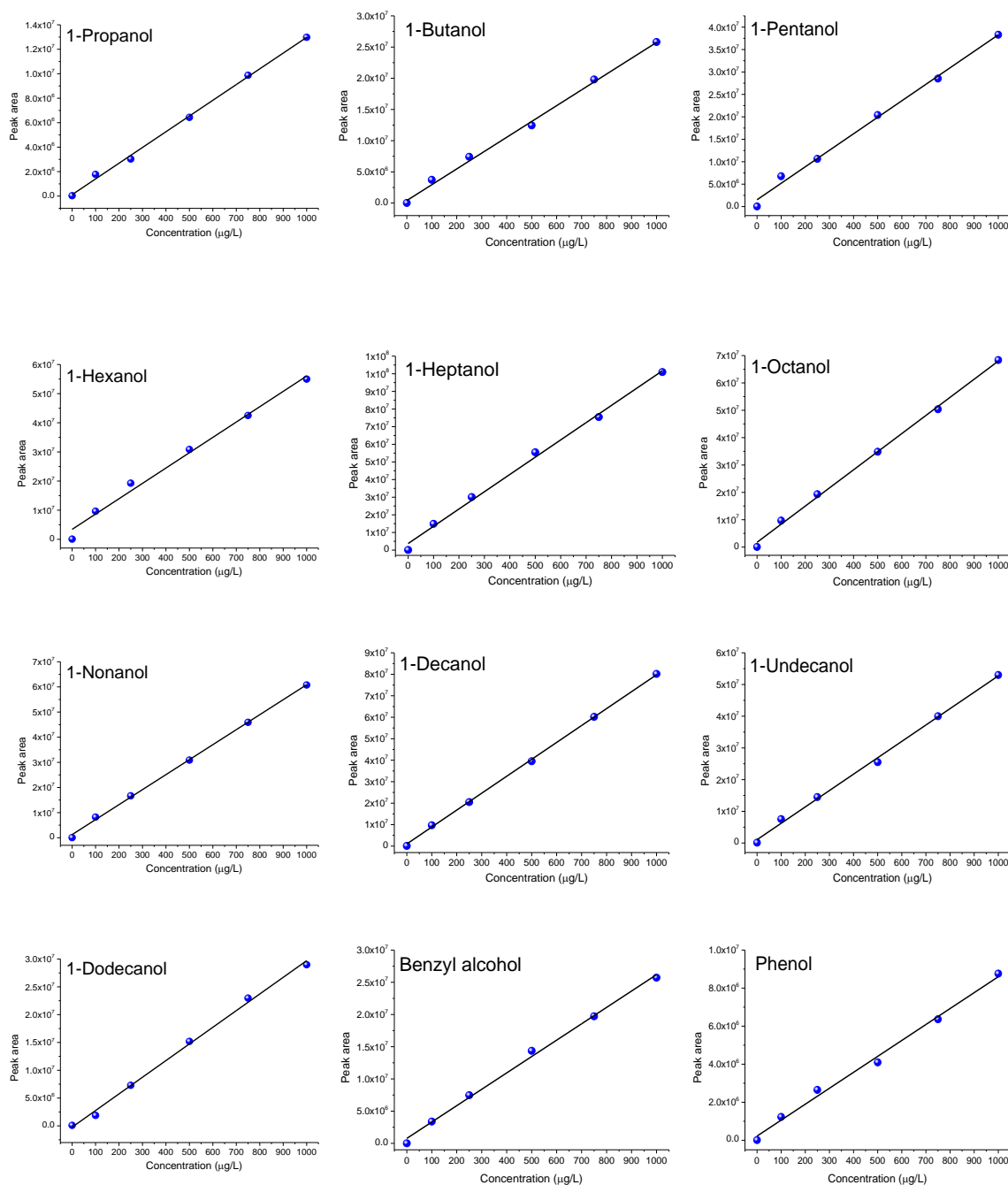


Figure 2.S4. Calibration curves of twelve standard compounds.

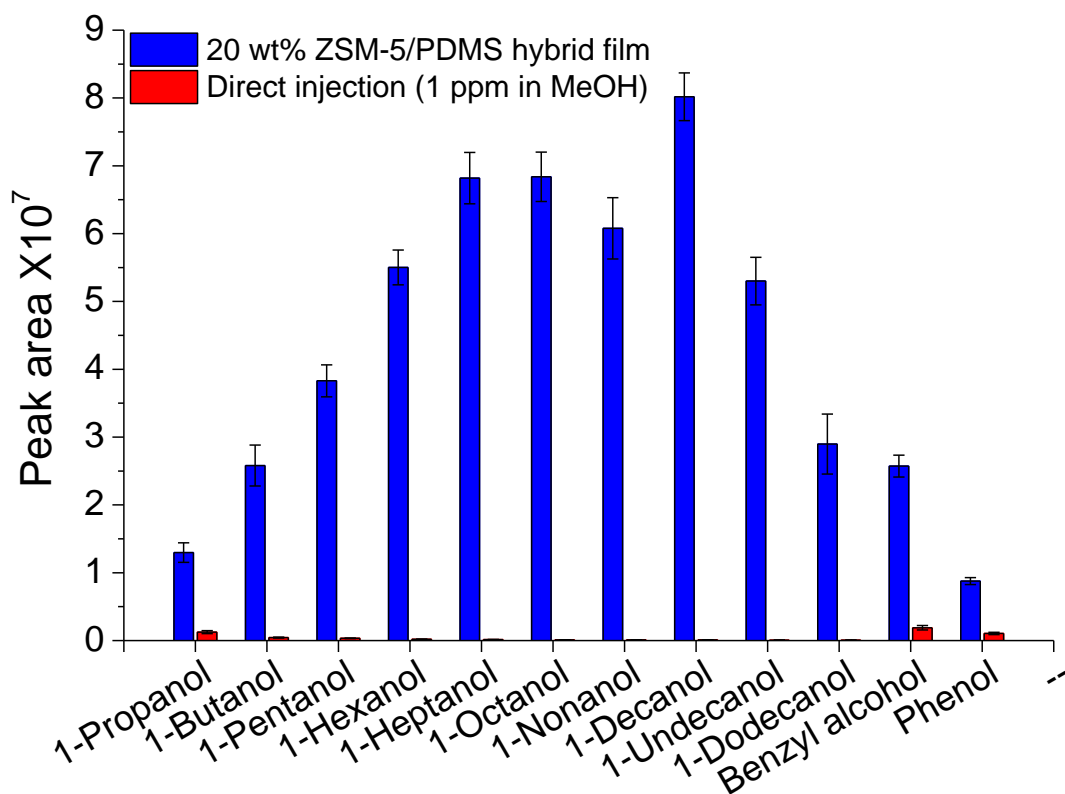


Figure 2.S5. Comparison of the peak areas of twelve analytes: (■) extracted from a 50 mL standard aqueous solution (1.0 ppm each component) using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film and (■) dissolved in methanol (1.0 ppm each component).

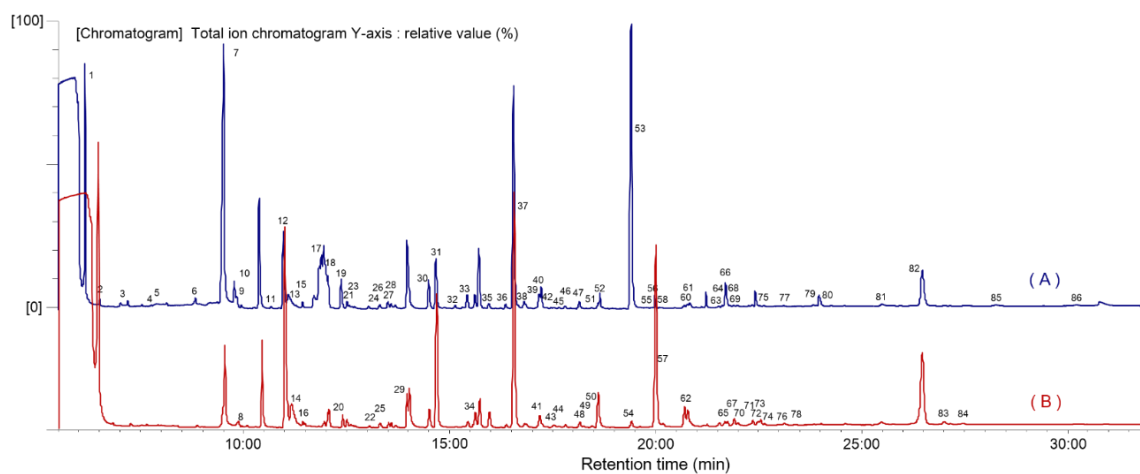


Figure 2.S6. Typical total ion chromatograms of VOCs contained in two soft drinks.

Table 2.S2. VOCs identified from two soft drinks.

No.	Compounds	Retention Time (min)	Selected Ion (m/z)	Relative content (%)		No.	Compounds	Retention Time (min)	Selected Ion (m/z)	Relative content (%)	
				A	B					A	B
1	Ethanol	6:08	31	9.001	15.6	44	Ethanone, 1-(4-methylphenyl)	17:37	119	0	0.09
2	2-Pentanone	6:30	43	0.3	0.2	45	Nerol	17:39	69	0.1	0
3	Butanoic acid	7:11	60	0.8	0.1	46	Perillal	17:47	68	0.1	0.1
4	Undecane	7:46	57	0.08	0.1	47	Guaiol	18:08	69	0.9	0
5	Hexanal	7:48	56	0.1	0	48	Lemonol	18:09	69	0	0.4
6	β -Myrcene	8:49	69	0.7	0.2	49	p-Cymen-8-ol	18:14	135	0	0.09
7	D-Limonene	9:30	68	27.7	7.8	50	1-Cyclohexene-1-methanol, 4-(1-methylethenyl)-, acetate	18:26	119	0	0.03
8	2-Hexenal, (E)	10:02	55	0	0.05	51	Carveol	18:27	84	0.03	0
9	Hexanoic acid, ethyl ester	10:03	60	0.02	0.06	52	Benzyl alcohol	18:35	79	0.5	2.7
10	3-Carene	10:15	93	0.07	0.01	53	Menthol	19:24	71	15.8	0.1
11	p-Cymene	10:40	119	0.2	0.03	54	Nerolidol	19:36	71	0	0.01
12	Octanal	10:57	57	4.9	8.8	55	Orcinol	19:44	124	0.1	0
13	2-Propanone, 1-hydrox	11:16	43	0.1	0	56	Perillol	19:52	67	0.02	0
14	Ethoxycitronellal	11:25	59	0	0.4	57	Eugenol	19:59	164	0	16.6
15	Lactic acid	11:25	45	0.5	0	58	Nerolidol	20:10	69	0.02	0.1
16	Propanoic acid, 2-hydroxy	11:28	45	0	0.4	59	Caryophyllenyl alcohol	20:41	111	0	0.5
17	1-Hexanol	11:52	43	0.6	0	60	Hedycaryol	20:46	59	0.1	0.5
18	Cyclohexane, methyl	12:10	55	0.02	0	61	Isohomogenol	20:49	178	0.2	0
19	1,2-Butanediol	12:22	59	1.4	0	62	β -Eudesmol	21:10	149	0	0.03
20	Acetic acid, hydroxy	12:23	31	0	0.7	63	Ledol	21:32	69	0.04	0.07
21	Nonanal	12:30	57	0.3	0.4	64	Thymol	21:37	135	0.2	0
22	Benzene, 2-ethenyl-1,3-dimethyl	13:08	132	0	0.03	65	3,7-Cycloundecadien-1-ol, 1,5,5,8-tetramethyl	21:40	82	0	0.1
23	2-Hexen-1-ol, (Z)	12:37	57	0.2	0.07	66	Isohomogenol	21:41	178	3.01	0
24	3,5-Dimethylstyrene	13:10	132	0.02	0	67	γ -Eudesmol	21:44	161	0	0.1
25	cis-Linalool Oxide	13:17	59	0	0.2	68	tau-Murolol	21:53	95	0.03	0.1
26	1-Heptanol	13:18	70	0.3	0.2	69	Hexadecanoic acid	21:58	60	0.1	0
27	Furfural	13:29	96	0.9	0.5	70	δ -Cadinol	21:59	161	0	0.1
28	Acetic acid	13:34	43	0.2	0.2	71	α -Cadinol	22:21	95	0	0.1
29	Decanal	13:57	57	0	10.7	72	Juniper camphor	22:29	189	0	0.06
30	β -Linalool	14:29	71	2.4	0.8	73	Isolongifolan-8-ol	22:32	166	0	0.4
31	1-Octanol	14:39	56	2.8	7.2	74	Globulol	22:38	81	0	0.02
32	Fenchol	15:07	81	0.3	0.04	75	Juniper camphor	22:38	189	0.02	0
33	L-4-terpineol	15:25	71	1.5	0.4	76	n-Decanoic acid	22:58	60	0	0.06
34	Carbamic acid, methyl ester	15:33	44	0	0.2	77	Ledo	23:06	189	0.02	0.03
35	1-Nonanol	15:56	56	0.3	0.8	78	Farnesol	23:23	69	0	0.03
36	β -Terpineol	16:21	71	0.3	0.1	79	9-Cedranone	23:49	205	0.02	0
37	α -Terpineol	16:32	59	18.1	17.2	80	Pentacosanoic acid	24:15	60	0.03	0
38	Linderol	16:39	95	0.2	0	81	Hydroxymethylfurfurole	25:30	97	0.3	0.2
39	α -Methylbenzyl butyrate	17:05	105	0.08	0	82	Nootkatone	26:28	147	1.5	2.4
40	Carvol	17:10	82	1.3	0	83	2,2,7,7-Tetramethyltricyclo [6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one	27:00	175	0	0.2
41	10-Undecenal	17:11	82	0	0.4	84	o-Hydroxybiphenyl	27:27	170	0	0.2
42	2(5H)-Furanone	17:20	55	0.2	0.1	85	Benzyl benzoate	28:14	105	0.3	0
43	Geranyl vinyl ether	17:29	69	0	0.1	86	Tetrahydrofurfuryl acetate	30:12	71	0.7	0

第 3 章

唾液・尿中 VOC に基づいた ヒト代謝情報の解析

3.1 緒言

厚生労働省の調査によると癌(悪性新生物)による日本人の死者数は毎年 30 万人以上であり、癌の早期発見(早期診断)は現代医療において最も重要な関心事となっている[1]。癌早期発見のための最近のアプローチとして、陽電子放射断層撮影(Positron Emission Tomography, PET)による癌検査方法が注目されているが、造影剤の安全性、検査費用、部位(組織)ごとに診断結果の正確さが異なるなどの課題を抱えている[2]。一方、生理学的または病理学的プロセスや治療薬に対する薬理学的反応の判断指標としてバイオマーカーが広く用いられている。これまで DNA や mRNA, タンパク質、血管新生物、神経伝達またはホルモン作用に関わる様々な物質がバイオマーカーの候補となってきた[3]。それに加え、人体から排出される揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds, 以下 VOCs)が体内の健康状態を反映し、癌を初めとする様々な病気と深く関係していることが最近の研究から明らかになっている[4]。

1971 年に Zlatkis らによって、液-液抽出法に基づいたガスクロマトグラフィー質量分析(Gas Chromatography–Mass Spectroscopy, 以下 GC–MS)から人の尿に含まれている VOC が初めて調べられ[5]、それをきっかけに呼気[6,7]、皮膚[8]、尿[9]、唾液[10]、汗[8]、血液[8]などに広く展開されてきた[11]。しかし、血液は被験者に苦痛を与えることや 20 mL 以上の採血が困難であることから VOC 分析に不向きである[12]。唾液または尿は血液より搬送・保存が容易で、病気の診断、免疫検査、薬物・毒物の検査など生体試料として高い利用価値がある[13]。人の唾液はタンパク質、ペプチド、ホルモン、VOC などを含み、体の健康状態を反映する[14]。血液中の VOC は一般的に受動拡散を介し、唾液に転送される。そのため、唾液中の VOC は血液中の生化学的情報を反映する。唾液は、血液と異なり、赤血球や白血球、血小板などの細胞成分がほとんどなく、凝固すること

もない。従って、唾液分析は体の生理学的および病理学的状態を調べるための潜在的な方法であると考えられる。一方で、唾液中の VOC に関する報告は少なく適切な生体試料として認められていないのが現状である[12]。唾液の利用が停滞している主な原因には唾液中の成分が血液と比べ、1/1000 にも満たないことやまだ適切な分析方法が確立されていないことなどが挙げられる[14]。

一般的に、VOC の分析に GC-MS が用いられるが、固相マイクロ抽出法(Solid Phase Microextraction, 以下 SPME) [15]と GC-MS を併用することで、より高感度な分析が可能となっている[16]。しかし、従来の SPME 法はデバイスの吸着面積、熱脱離による吸着剤の劣化などの問題点がある。近年、薄膜抽出法(Thin Film Microextraction, 以下 TFME)が抽出相の体積と表面積、熱・化学的安定性、高い気孔率などの利点から、従来の SPME 法より高い VOC 抽出効果と感度を提供する。Reyes-Gares らは親水性-親油性にバランスの取れたポリアクリロニトリル系の抽出薄膜を開発し、血液や尿中 VOCs の分析を行った[17]。Bessonneau らは同様な抽出方法を唾液中の VOC 分析に展開した[18]。両方とも TFME 薄膜の大きい表面積の利点を利用して高感度の VOC 分析を可能にしている。

本研究では従来から固相抽出に多く用いられているジメチルポリシロキサン(以下、PDMS)吸着マトリックスにゼオライトの一種である ZSM-5 をハイブリッドした吸着デバイスの GC-MS 分析に基づき、健常者の唾液および尿に含まれた微量の VOC 分析を試みた。PDMS は多孔質ポリマーであり、SPME の修飾材料として最も広く利用されている。ZSM-5 はサイズが 1 nm 以下の細孔を有する多孔質材料であり、多くの有機物の吸着と触媒反応に応用されている[19]。PDMS と ZSM-5 を複合化することによって両方の吸着特性を最大に活用することができる。また、口腔がん患者の唾液中 VOC 分析を行い、健常者との比較を通じて新規ヒト唾液中 VOC バイオマーカーの発見を実証した。最後に、肺がん細胞お

および肺正常細胞培養から細胞培養における肺がんの VOC バイオマーカー情報を見出した。被験者二人の約一か月間連続尿試料と 20 名の被検者集団の一日の尿試料の分析を行い、肺がん細胞培養中 VOC 分子と照らし合わせて直接にヒト代謝物からがんなどの疾患の識別の可能性を検討した。本研究は人の唾液および尿中に含まれる分子量が数十から数百までの多くの VOC 分子情報をもとに、疾患に高い相関性を示す新規バイオマーカーの発見を目指した。

3.2 実験項目

3.2.1 使用試薬

ZSM-5($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3=30$, Lot 110421)は日揮触媒化成株式会社から購入した。PDMS 溶液キット(Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit)は Dow Corning Ltd から購入した。ベース溶液(Sylgard 184A)と硬化剤溶液(184B)は 10:1 の比率で混合し、PDMS ポリマーを製造した。メタノールは和光純薬株式会社から購入した。実験に用いた化合物は全て分析等級であり、更に精製することなく使用した。脱イオン純水($18.3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)はイオン交換および濾過(ミリポア、direct QTM)に続いて逆浸透によって得た。

3.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製

50 mL のガラス瓶に瓶を PDMS/ZSM-5 複合膜の支持体として使用した。PDMS モノマーに対して重量比が 20 wt%になるように ZSM-5 を加えて均一に混ぜ、1.0 g の混合試料をサンプル瓶の底に垂らし、室温で 3 日間静置し PDMS モノマーを硬化させた。更に、PDMS/ZSM-5 複合膜を 100°C の乾燥機の中に 1 時間熱処理を行った後、メタノールを振とうさせながら 3 日間複合膜の洗浄を行った。

同様に ZSM-5 を添加していない PDMS 単体膜を作製して PDMS/ZSM-5 複合膜との比較に用いた。

3.2.3 唾液および尿のサンプリング

ZSM-5/PDMS 複合膜のサンプル瓶に唾液 2.0 mL とイオン交換水 3.0 mL を入れ、3 時間の振とう後、唾液を捨て純水による洗浄と窒素乾燥を行った。次に、100 μ L のメタノールを入れ、抽出膜から 30 分間 VOCs の脱離を行い、その内 1.0 μ L を GC-MS 測定に用いた。抽出に必要なすべての操作は 30 $^{\circ}$ C で行った。健康者 8 名から最低 5 日間連続して唾液の採取を行った。尿は、健康な被験者 5 名から 5 日間連続して起床してすぐに集めた初尿 50 mL を 3 時間振とうさせた後、唾液と同様の抽出過程を経て GC-MS 分析を行った。また、健康な 24 歳男性と 27 男性に朝起きてから一回目の尿を 50 mL 採取した。2 名の尿は、継続して約 20 日測定を行った。同様の手法を用いて 15 名の健康な男性と女性から尿サンプルを得た。すべての尿サンプルは、上記の抽出手法を用いて GC-MS 測定に使用された。舌がん患者 5 名の唾液を健康者と同様な条件で連続に 3 日間採取した。唾液中 VOC 成分の変質や揮発を防ぐために、採取したがん患者の唾液試料は、GC-MS 測定するまでに -80 $^{\circ}$ C で保管した。

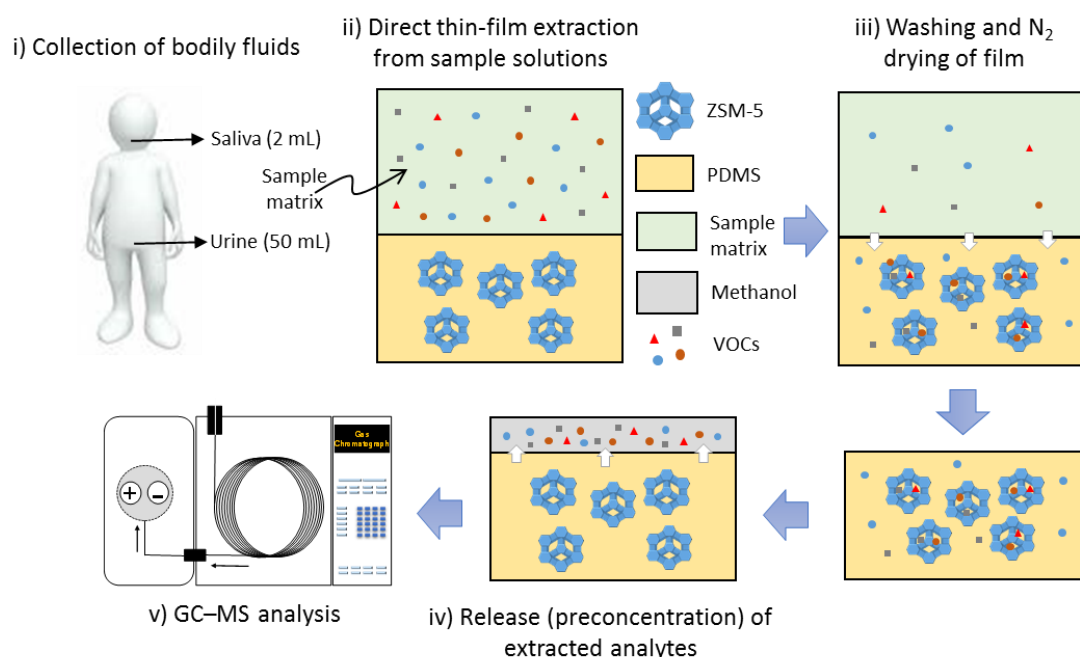


Figure 3.1. Schematic illustration of GC–MS analysis of organic volatiles via ZSM-5/PDMS hybrid-film extraction.

3.2.4 肺癌および肺正常細胞の連続培養

細胞はヒト肺正常細胞(OUS-11)および、ヒト肺基底上皮腺癌細胞(A549)細胞は、理研 CELLBANK RCB0007)は、RIKEN CELLBANK, japan から入手した。細胞培養培地は、高グルコース DMEM 培地(Dilbecco's modified Eagle medium, 4.5 g/L, 6.0 mL, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo)を使用した。具体的に、ウシ胎児血清(FCS, Biowest France Nuaille) 10%, ペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(100 mg/mL)、グルコース(PSG) 1%を混合して使用した。細胞を含む DMEM 培地から適量取り出し、DMEM 培地 6 ml を含む直径が 10 cm のプラスチックシャーレへ 5×10^5 cells/dish となるように HeLa 細胞を播種した。OUS-11 および A549 細胞培養は、37°Cで 95%の空気と 5%の CO₂、96 時間ウォータージャケット型インキュベーター内で培養した。96 時間後、細胞の継代を行った。初め

に、PBS (pH 7.2 リン酸バッファー溶液)と Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin-EDTA 100 mL, GIBCO-25300-054)を湯浴にて 37°Cに温めた。滅菌済み 10 mL ガラスピペットで、培地を取り除き、5 mL ガラスピペットで PBS を 3 mL シャーレに加え軽く揺すり、細胞を洗浄した。これを 2 回行った後 PBS を取り除き、Trypsin-EDTA を 1.0 mL 加え、シャーレをインキュベーター内に 5 分間戻し、細胞をシャーレ底面から剥ぎ取った。その後、シャーレ円状にピペッティングを行い、細胞の塊をほぐした。DMEM 培地 1 mL を加え、良く馴染ませた後、15 mL チューブへと移し 13 mL にメスアップした。それを 1000 rpm、3 分遠心分離機にかけて分離し、上澄み培地を取り除き、新たな DMEM 培地 2 mL を加えた。セルカウンタープレートを用いて、細胞数を計算し、 5×10^5 cells/dish となるように、培地 6 mL が入った新たなシャーレへ細胞を播種した。このように、観察、培地交換、継代を繰り返して、細胞の管理を行った。96 時間後に培地交換を行ったもの(5 mL \times 3)を GC-MS 測定試料とした。また、培地交換の際に、DMEM 培地のみを入れたシャーレをブランクとして同様にインキュベーター内へ設置した。以上の細胞培養手順を 5 回繰り返して、OUS-11 および A549 細胞の同時に 5 世代培養した。世代毎に、培養シャーレ 3 つ分を播種し、96 時間後に二種類の細胞の細胞培養済み DMEM(5 mL \times 3)を回収して、ZSM-5/PDMS 薄膜抽出を経て、GC-MS 測定に用いた。比較のために、細胞培養と同時に、同じ培養環境下に DMEM 培地(6 mL)が入っているシャーレ一つを用意した。

3.2.5 GC-MS 測定条件

GC-MS 分析には JMS-Q1000GC(JEOL, Japan)を用いた。キャピラリーカラムは DB-WAX(ポリエチレングリコールベースの高極性固定相、内径 0.25 mm、吸着層厚み 0.5 μ m、長さ 30 m)を用いた。GC 注入口の温度は 230 °C でキャピラリー


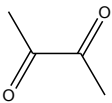
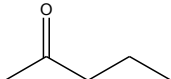
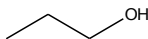
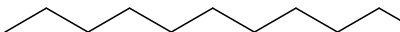
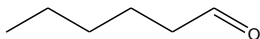
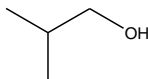
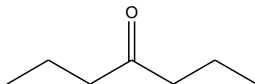
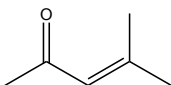
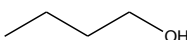
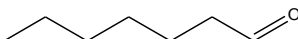
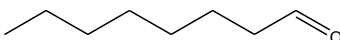
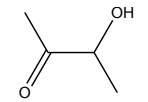
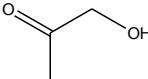
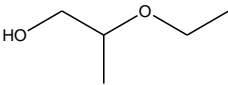
カラムの温度は 40 °C で 3 分間保持し、10 °C/min で 230 °C まで昇温し、10 分間保持して測定した。キャリアガスは超高純度ヘリウムガス(純度 99.999%)を 1 mL/min の速度で流した。測定は、Splitless モードで行った。MS 設定については動作条件が電子衝突イオン化モードで 70 eV とした。イオン源および GC インタフェースの温度はそれぞれ 200 °C および 230 °C に設定した。データ解析はフルスキャンモードで($m/z=25\sim 310$)、スキャンタイム 0.3 秒で行った。同定には National Institute of Standards and Technology (NIST)マスペクトルライブラリーサーチ(JEOL version 1.5)ソフトウェアを用いた。

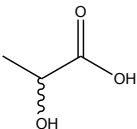
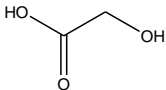
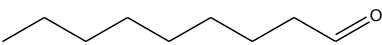
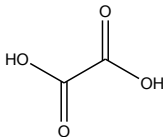
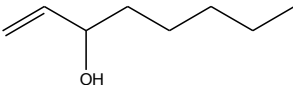
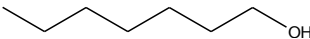
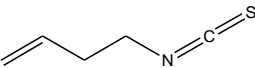
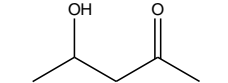
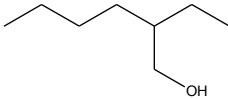

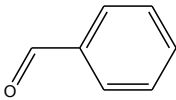
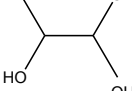
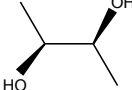
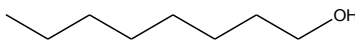
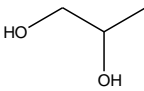
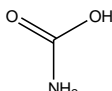
3.3 結果および考察

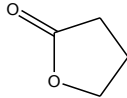
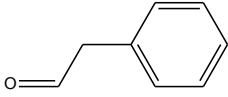
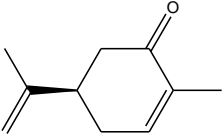
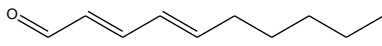
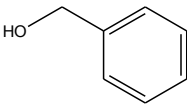

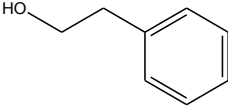
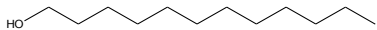
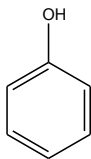
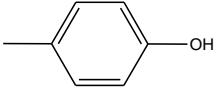
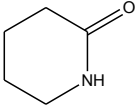
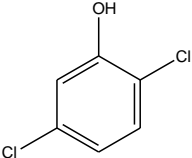
3.3.1 ヒトの唾液および尿中 VOC 情報


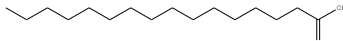
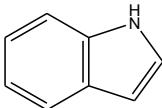
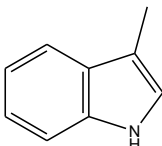
ZSM-5/PDMS 複合膜に導入した ZSM-5 の影響を調べたところ、含有量が 20 wt%の時に最も高い抽出効果が見られた。また、20 wt%以上の含有率ではゼオライトの分散性や膜の安定性が低下したため、本研究では唾液および尿中 VOCs の抽出に ZSM-5/PDMS(20 wt%)複合膜を用いた。唾液分析に用いた 8 名の被験者の中で 6 名は 20 代男性であり、それぞれの被験者に対して 5 日間サンプルを採取して分析を行った。残りの 2 名は中年の男性および 20 代の女性であり、それぞれ 8 回と 13 回サンプルを採取した。唾液や尿などの生体試料中に含まれる VOCs には体内の代謝による内因性成分や飲食・日常生活などの影響による外因性成分が混在し、日によって変動する可能性が極めて高い[20]。尿サンプルの GC-MS 分析は唾液を提供した 20 代男性 6 名から唾液採取日と同じ日に採取した尿を用いて行った。本研究では GC-MS 分析に用いた唾液および尿サンプルの数はそれぞれ 51 個と 30 個であった。

Table 3.1. VOCs extracted from saliva and urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

No.	Compounds	Structure	RT (min)	SI (<i>m/z</i>)	Class	Saliva (<i>n</i> = 8)	Urine (<i>n</i> = 6)
1	Ethanol		6:19	31	alcohol	D ^a	D
2	2,3-Butanedione		6:36	43	ketone	D	
3	2-Pentanone		6:40	43	ketone	D	D
4	1-Propanol		7:27	31	alcohol	D	D
5	Undecane		7:50	57	alkane	D	D
6	Hexanal		7:56	44	aldehyde	D	D
7	2-Methyl-1-propanol		8:08	43	alcohol		D
8	4-Heptanone		8:27	71	ketone		D
9	4-Methyl-3-penten-2-one		8:40	55	ketone	D	
10	1-Butanol		9:01	56	alcohol	D	
11	Heptanal		9:24	43	aldehyde	D	D
12	Octanal		10:58	43	aldehyde	D	D
13	3-Hydroxy-2-butanone		11:07	45	ketone	D	D
14	1-Hydroxy-2-propanone		11:19	43	ketone	D	D
15	2-Ethoxy-1-propanol		11:27	45	alcohol		D

16	2-Hydroxypropanoic acid		11:30	45	acid	D	D
17	Hydroxyacetic acid		12:21	31	acid		D
18	Nonanal		12:27	57	aldehyde	D	D
19	Ethanedioic acid		12:30	59	acid	D	
20	1-Octen-3-ol		13:10	57	alcohol	D	
21	1-Heptanol		13:18	56	alcohol	D	
22	4-Isothiocyanato-1-butene		13:20	72	isothiocyanate		D
23	4-Hydroxy-2-pentanone		13:31	43	ketone		D
24	2-Ethyl-1-hexanol		13:44	57	alcohol	D	D
25	Pyrrole		14:08	67	heterocyclic		D
26	Benzaldehyde		14:25	77	aldehyde	D	D
27	2,3-Butanediol		14:27	45	alcohol	D	D
28	(R,R)-2,3-Butanediol		14:54	45	alcohol		D
29	1-Octanol		14:38	56	alcohol	D	
30	Propylene glycol		15:00	45	alcohol		D
31	Carbamic acid		15:33	44	acid		D

32	Butyrolactone		15:53	42	ester	D	D
33	Benzeneacetaldehyde		15:56	91	aldehyde	D	
34	Levo-carvone		17:10	82	ketone		D
35	(E,E)-2,4-Decadienal		17:54	81	aldehyde	D	
36	Benzyl alcohol		18:35	79	alcohol	D	
37	Dimethyl sulfone		18:54	79	organosulfur		D
38	Phenylethyl alcohol		19:00	91	alcohol	D	D
39	1-Dodecanol		19:23	55	alcohol	D	
40	Phenol		19:54	94	phenol	D	D
41	4-Methylphenol		20:40	107	phenol	D	D
42	2-Piperidinone		21:34	99	lactam	D	D
43	2,5-Dichlorophenol		21:51	162	phenol		D

44	Docosanoic acid		21:54	74	acid	D
45	Hexadecanoic acid		22:03	74	acid	D D
46	Indole		24:52	117	heterocyclic	D
47	3-Methylindole		25:34	130	heterocyclic	D

^a 全ての化合物は、健康なヒトの唾液または尿中に存在するかまたは存在しないことを示す。

ZSM-5/PDMS 複合膜を用いて得られた唾液および尿中 VOCs の分析結果を **Table 3.1** に示す。質量分析による VOCs の特定には 700 以上の類似度を示した化合物のみを用いた。尿分析には 50 mL のサンプルを用いたが、唾液の場合は分泌量が尿に比べ比較的に少ないため、2.0 mL の唾液に 3.0 mL のイオン交換水を加え、試料の流動性を向上させた。本研究において被験者一人当たりの唾液または尿から約 50~100 種類の VOCs が検出されたが、その中の一部の VOCs において良好な日間再現性が現れた。すべての被験者から良好な日間再現性を示した VOCs は唾液と尿においてそれぞれ 34 と 33 成分であった。被験者の唾液と尿の GC-MS 分析から絞られた 47 成分 (**Table 3.1**) は、良好な日間再現性を示し、日常生活などの外的要因に大きく影響されないことがわかる。

3.3.2 ヒトの唾液および尿中 VOCs の出現頻度

本研究で試みた連続サンプリング法は得られた各 VOCs の出現頻度をもとに外的影響を排除するのに役に立つ。検出された各成分の日間再現性を表す指標

として、‘出現頻度 (appearance frequency, 以下 AF)’を用いた。検出された各成分の AF は、毎回の分析において検出できる確率を意味し、下記の式 1 より見積もられた。

$$AF = \frac{\text{検出された回数}}{\text{全分析回数}} \quad (1)$$

見積もられた AF 値を、0.7 以上($AF \geq 0.7$)、0.5 以上 0.7 未満($0.7 > AF \geq 0.5$)、0.5 以下($AF < 0.5$)の 3 つのグループに分類し、**Table 3.1, 3.2** にまとめた。 $AF \geq 0.7$ の VOCs は唾液と尿からそれぞれ 13 と 8 成分であり、6 つの共通成分が検出された。 $AF \geq 0.7$ の VOCs は多くの被験者の唾液または尿に存在し、外因性と個人差と関係なく人体の一般的な代謝物であると考えられる。 $0.7 > AF \geq 0.5$ の範囲に属する VOCs は唾液と尿からそれぞれ 2 と 9 成分であった。 $AF < 0.5$ の VOCs は唾液と尿からそれぞれ 19 と 16 成分であり、5 つの共通成分が検出された。特に、AF 値が低い成分は良好な日間再現性を示すものの一部の被験者に限って検出されている。生体試料を分析する際に、VOCs の個体間の変動や、内因性と外因性を識別することは非常に困難な作業である。Al-Kateb らはヘッドスペーストラップ GC-MS 法によって健常者 10 人の 10 日間の連続唾液分析を行い、すべての唾液サンプルから 317 成分を検出したが、毎回検出された成分の数は 34 であり、顕著な日間または個体間変動が見られることを報告している[21]。本研究は同一被験者から連続して生体試料を採取することで、VOCs の出現頻度をもとに日間変動と個体間変動を考慮した有意な VOC 分子情報の収集が可能になったことに大きな意義がある。

Figure 3.2 に、同一被験者から同じ日に採取した唾液 (a) および尿 (b) サンプルの ZSM-5/PDMS 複合膜を介した GC-MS トータルイオンクロマトグラム(以

下、TIC)を示す。**Table 3.1** に示した 47 成分のピークに番号を付け、2 つの TIC に表した。47 成分以外にも多くの成分が検出されたが、それらの成分は外因性の日間変動性の化合物である可能性が高い。**Figure 3.2** から分かるように、唾液と尿の TIC は、大きく異なり、TIC の複雑さからより多くの成分が唾液中に含まれていることがわかる。**Table 3.1** からわかるように、唾液と尿からそれぞれ 34 と 33 成分が検出でき、両生体試料に共存する成分を除くと 23 と 22 成分となる。両生体試料において共通成分が少なく検出成分が異なる理由はそれぞれの VOCs の発生源と代謝経路の違いが原因であると考えられる[9]。注目すべきことは 1-プロパノール(1-propanol)、1-ブタノール(1-butanol)、シュウ酸(ethanedioic acid)、マツタケアルコール(1-octen-3-ol)、ベンジルアルコール(benzyl alcohol)、フェネチルアルコール(phenylethyl alcohol)およびインドール(indole)の人唾液における AF 値は 0.7 以上であり、殆どの被験者の唾液から検出されたが、尿からは殆ど検出されていないことである。これらの成分は血液中に多く存在するが、他の代謝成分に変化した可能性が高い。

Table 3.2. Classification based on *AF* of VOCs showing day reproducibility in saliva and urine.

Groups	Compounds	Saliva <i>AF</i> (<i>n</i> = 8)	Groups	Compounds	Urine <i>AF</i> (<i>n</i> = 6)
<i>FA</i> \geq 0.7	Ethanol	1.00	<i>FA</i> \geq 0.7	Ethanol	1.00
	2-Pentanone	1.00		2-Pentanone	1.00
	3-Hydroxy-2-butanone	1.00		1-Hydroxy-2-propanone	1.00
	Phenol	1.00		Phenol	1.00
	Hexadecanoic acid	1.00		Hexadecanoic acid	1.00
	1-Propanol	1.00		Dimethyl sulfone	1.00
	Undecane	1.00		3-Hydroxy-2-butanone	0.83

	1-Octen-3-ol	1.00		2-Piperidinone	0.83
	1-Butanol	0.75		Hexanal	0.67
	1-Hydroxy-2-propanone	0.75		4-Heptanone	0.67
	2-Hydroxypropanoic acid	0.75		Pyrrole	0.67
	Phenylethyl alcohol	0.75		2,3-Butanediol	0.67
	Indole	0.75	$0.7 > FA$	Propylene glycol	0.67
$0.7 > FA \geq$	Ethanedioic acid	0.63	≥ 0.5	Carbamic acid	0.67
0.5	2-Piperidinone	0.63		Undecane	0.50
	Nonanal	0.38		2-Hydroxypropanoic acid	0.50
	2-Ethyl-1-hexanol	0.38		(R,R)-2,3-Butanediol	0.50
	2,3-Butanediol	0.38		Butyrolactone	0.50
	Benzyl alcohol	0.38		Octanal	0.33
	4-Methylphenol	0.38		Hydroxyacetic acid	0.33
	2,3-Butanedione	0.25		2-Ethyl-1-hexanol	0.33
	3-Methylindole	0.25		1-Propanol	0.17
	Hexanal	0.13		2-Methyl-1-propanol	0.17
	4-Methyl-3-penten-2-one	0.13		Heptanal	0.17
	Heptanal	0.13		2-Ethoxy-1-propanol	0.17
	1-Octanal	0.13		Nonanal	0.17
	1-Heptanol	0.13		4-Isothiocyanato-1-butene	0.17
	Benzaldehyde	0.13		4-Hydroxy-2-pentanone	0.17
$FA < 0.5$	1-Octanol	0.13		Benzaldehyde	0.17
	Butyrolactone	0.13		Levo-carvone	0.17
	Benzeneacetaldehyde	0.13	$FA < 0.5$	Phenylethyl alcohol	0.17
	(E,E)-2,4-Decadienal	0.13		4-Methylphenol	0.17
	1-Dodecanol	0.13		2,5-Dichlorophenol	0.17
	Docosanoic acid	0.13		2,3-Butanedione	0
	2-Methyl-1-propanol	0		4-Methyl-3-penten-2-one	0
	4-Heptanone	0		1-Butanol	0
	2-Ethoxy-1-propanol	0		Ethanedioic acid	0
	Hydroxyacetic acid	0		1-Octen-3-ol	0
	4-Isothiocyanato-1-butene	0		1-Heptanol	0
	4-Hydroxy-2-pentanone	0		1-Octanol	0
	Pyrrole	0		Benzeneacetaldehyde	0
	(R,R)-2,3-Butanediol	0		(E,E)-2,4-Decadienal	0

Propylene glycol	0	Benzyl alcohol	0
Carbamic acid	0	1-Dodecanol	0
Levo-carvone	0	Docosanoic acid	0
Dimethyl sulfone	0	Indole	0
2,5-Dichlorophenol	0	3-Methylindole	0

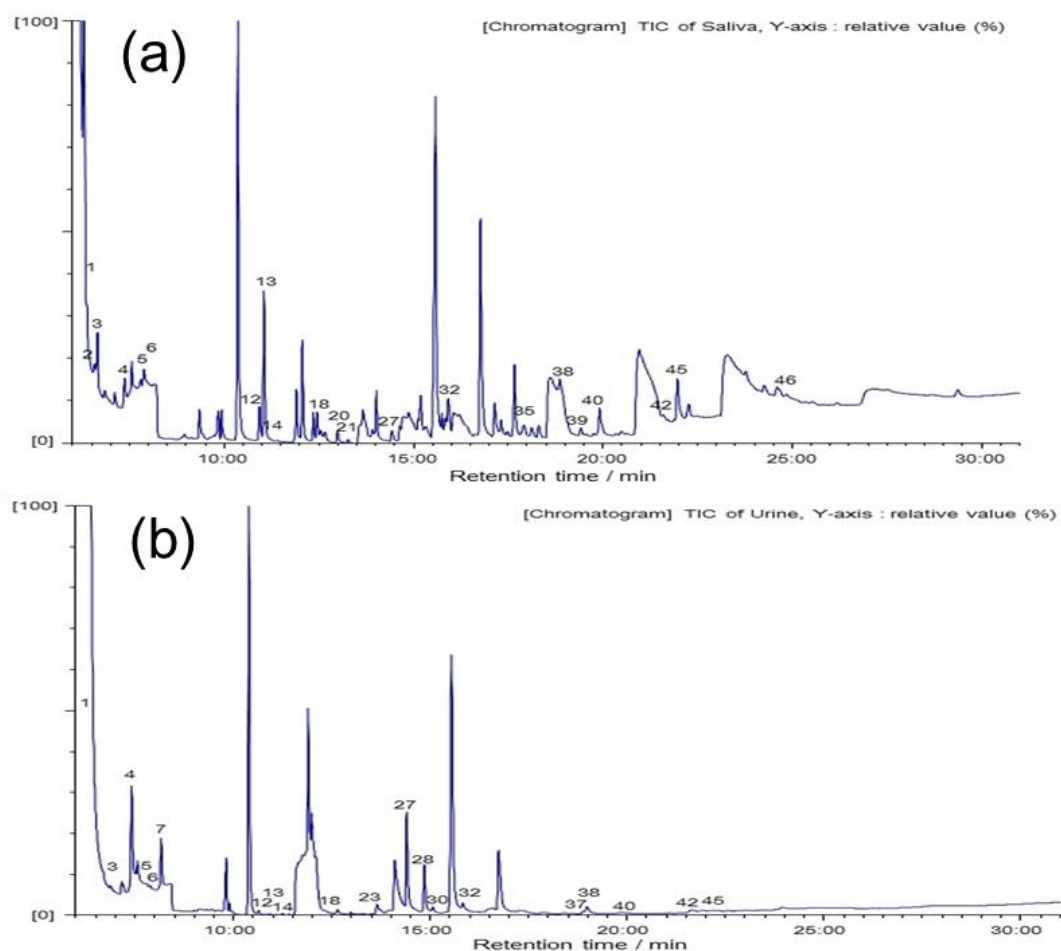


Figure 3.2. Typical TICs Typical of VOCs contained in both saliva (a) and urine (b) samples collected from the same subject on the same day.

3.3.3 ヒトの唾液および尿中 VOC 含有量の比較

唾液と尿に存在する VOCs の相対量を調べるために、両方において AF 値が共に 0.7 以上の 6 成分のピーク面積の比較を行った(**Figure 3.3**)。エタノール(ethanol)

は唾液と尿中に大きな差が見られなかったが、2-ペンタノン(2-pentanone)、ヒドロキシアセトン(2-propanone, 1-hydroxy)は唾液と比べ、尿中により多く存在する。一方で、アセトイン(2-butanone, 3-hydroxy)、フェノール(phenol)、パルミチン酸(hexadecanoic acid)は尿より唾液に多く存在する。しかし、約 50 mL の尿サンプルを用いたことに対し、唾液のサンプル量が 2.0 mL であることを考慮すると唾液中に存在する VOCs の濃度が高いことがわかる。このような結果は体からの揮発性代謝物を調べるのに唾液が非常に有用な生体試料であることを意味し、本研究手法が生体試料中の微量の VOC 分析に有用であると言える。

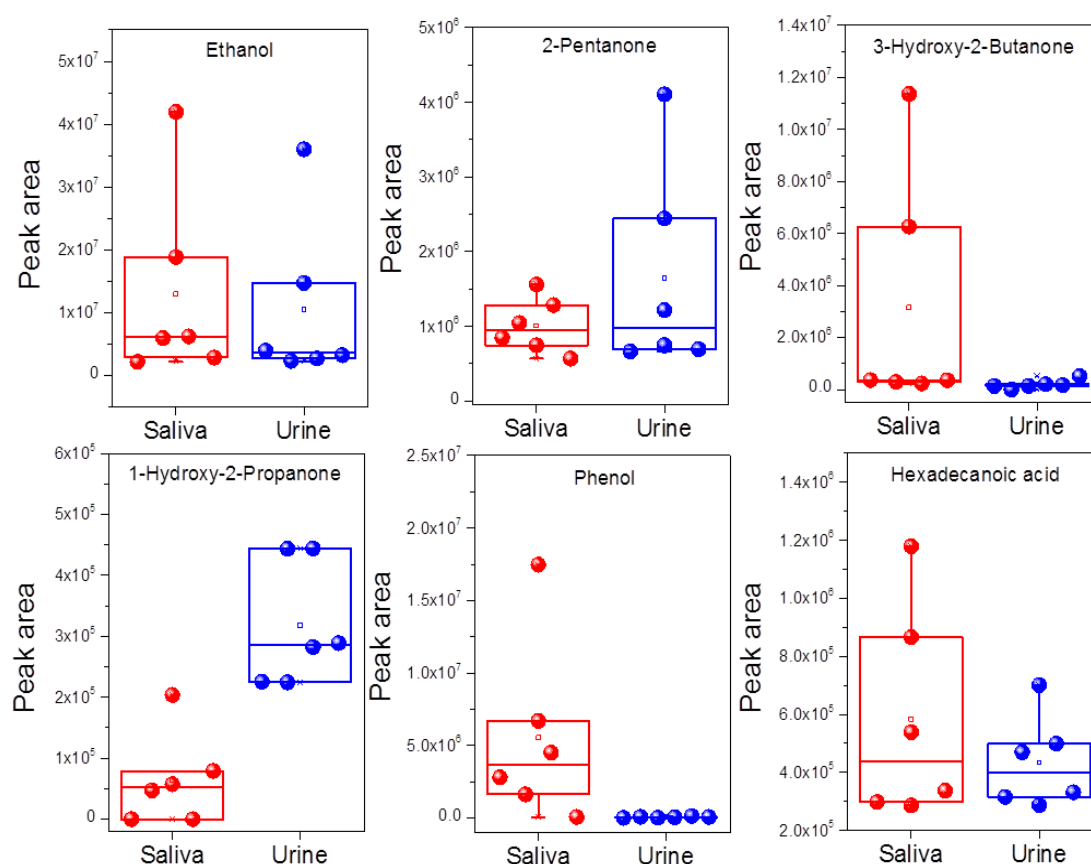


Figure 3.3. Comparison of average peak areas showing 6 VOCs ($FA \geq 0.7$) present in saliva and urine after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

3.3.4 官能基によるヒト唾液および尿中 VOCs の分類

Figure 3.4 のように、本実験に参加した 20 代男性被験者 6 名の同じ日に採取した唾液および尿から検出された VOCs を官能基ごとに分けると、アルコール、有機酸、アルデヒド、ケトン、フェノール、エーテル、ヘテロ環化合物の他、含硫黄化合物などと多様である。尿には主にアルコール類、ケトン類、有機酸類および 10%前後のヘテロ環化合物が大きな割合を示している。ここで、各官能基の割合は TIC の全ピーク面積に対する官能基ごとのピーク面積の相対比から求められた。唾液にはアルコール類、フェノール類に続いてケトン類が多く存在していることが分かる。興味深いことに、人によって唾液および尿中の VOCs の官能基別の相対比が大きく異なる。例えば、被験者 C の場合は唾液と尿からのアルコールが全体の約 71% および 65% であり、被験者の中で一番高い値を示す。さらに、被験者 C の唾液は約 3.3% の高いアルデヒド含有率を示し、他の被験者の 0.5% 以下の値より高い。これは被験者 C の生活習慣を反映する結果であり、恐らく日ごろの飲酒習慣と関係していると考えられる。

唾液と尿の両方に多く存在するケトン化合物は動物タンパク質と動物性脂肪の摂取によって代謝されると知られている。唾液からジアセチル(2,3-butanedione)、メシチルオキシド(3-penten-2-one, 4-methyl)が、尿から 4-ヘプタノン(4-heptanone)、4-ヒドロキシ-2-ペンタノン(2-pentanone-4-hydroxy)が検出された。両方に共通するケトン類は 2-ペンタノン(2-pentanone)、アセトイン、ヒドロキシアセトンである。

唾液にはインドール、スカトール(1h-indole-3-methyl)のようなヘテロ環化合物が多く存在する。インドールおよびスカトールは口臭の原因物質であり、インドールはアミノ酸の一種であるトリプトファンの細菌による分解によって生産される。スカトールは腸内の細菌特に悪玉菌による栄養物を分解によって

生成される悪臭物質であることが知られている。一方、ピロール(pyrrole)、1-ブテン-4-イソチオシアナト(1-butene, 4-isothiocyanato)、L-カルボン(levo-carvone)、2-ピペリジノン(2-piperidinone)のような含窒素化合物が尿から検出された。Zlatkis らは 1971 年に液-液抽出と GC-MS の分析によって尿中の最も特徴的な VOC 構成要素がジメチルスルフォン、ピロール、4-ヘプタノン-アリルイソチオシアネート、アルキルフラン、ケトン類およびラクトンであることを報告した [5]。

口臭の原因と言われているフェノールはすべての生体試料から検出されるが、尿より唾液に多く存在し、高い割合を示している。フェノール類である p-クレゾール(phenol-4-methyl)は通常の条件下でほぼ 100%血漿タンパク質の親油性部分と結合する。p-クレゾールはタンパク質分解の最終生成物であり、過剰に栄養タンパク質を摂取した場合、健常者の尿中に排出量が増加すると言われている。しかし、本研究では p-クレゾールの唾液および尿における AF 値はそれぞれ 0.38 と 0.17 であり、唾液中により多く含まれていることがわかる。

すべての被験者から検出されたジメチルスルフォン(dimethyl sulfone)は尿中に含まれる有機硫黄化合物と知られており、本研究でも尿のみから検出された。ジメチルスルフォンは血漿と正常なヒトの脳脊髄液に生じる代謝物である。また、体内の内因性メタンチオール代謝と腸内細菌の代謝によって生成されることが知られている [22]。さらにタマネギに多く存在するジメチルスルフォキシド(dimethyl sulfoxide)の体内(肝臓および腎臓)酸化によるジメチルスルフォンの生成も考えられる [23]。

唾液からはシュウ酸、ベヘン酸(docosanoic acid)、パルミチン酸、乳酸(propanoic acid, 2-hydroxy)の有機酸類が検出され、尿からはグリコール酸(acetic acid, hydroxy)、カルバミン酸(carbamic acid)、パルミチン酸および乳酸が検出された。

特に尿には大量のカルバミン酸が存在し、尿中の有機酸の割合が唾液より高いことがわかる。代謝物の中に含まれる有機酸は主に蛋白質の分解により体内に生成され、代謝プロセスにおいて重要な役割を果たすとともに、それらの濃度がいくつかの疾患と関係することが知られている。シュウ酸は多くの植物や野菜が生成する強力なジカルボン酸であり、グリオキシル酸またはアスコルビン酸の代謝によって体内で作られ、尿に排泄される。一方、シュウ酸は腎臓結石の原因となる化合物であり、約 80%の腎臓結石がシュウ酸カルシウムによって発生すると言われている。

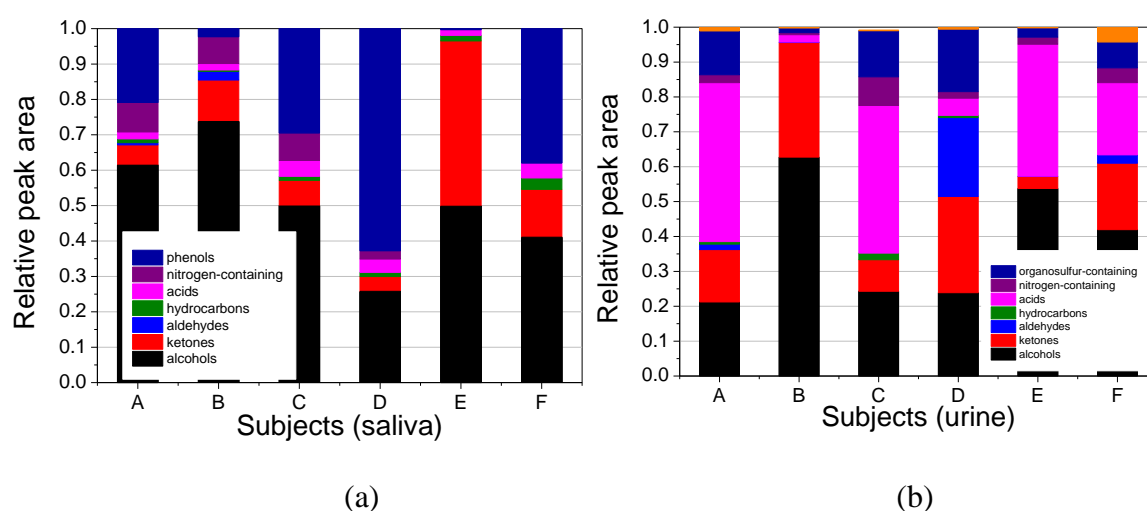
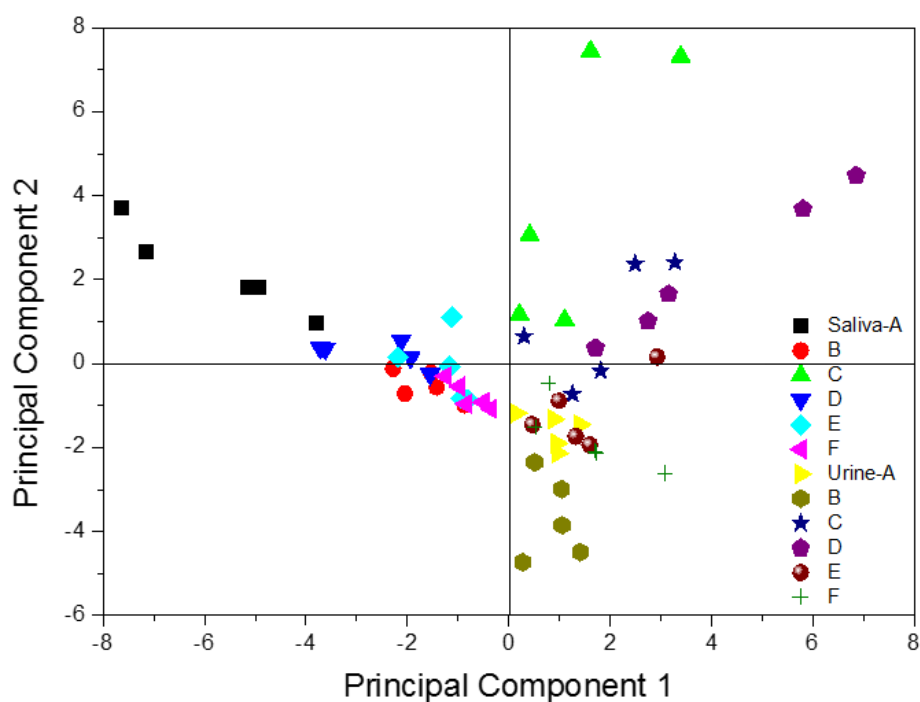


Figure 3.4. The relative peak area of compounds in each class that have been detected in human (a) saliva and (b) urine.

3.3.5 ヒト唾液および尿から検出した VOCs の PCA 解析

主成分分析 (PCA) は、20 歳代の男性 6 人の同日に採取した唾液および尿サンプルの比較と区別を行った。PCA 解析は、得られた VOCs のピーク面積を利用した。**Figure 5.5** は、PC1 対 PC2 のスコアプロット結果を示した。被験者 A, B, D, E, F の唾液サンプルは、負の PC1 値を示し、被験者 C は、正の PC1 値を示

した(**Figure 5.5a**)。そして、被験者 B, D, E, F の PC1 スコアが類似していることがわかる。被験者 A と C の唾液サンプルは、他の被験者との区別ができた。ローディングプロット(**Figure 5.5b**)は、被験者 C の唾液から nonanal, heptanal, ocranal および hexanal のアルデヒド類化合物が検出された。これは、被験者 C の官能基に基づく分類の結果と一致する。被験者 C の生活習慣によって引き起こされ得る。一方で、被験者 A の唾液から、3-methylindole, indole, benzyl alcohol, benzeneacetaldehyde, 4-methylphenol および phenol が多く検出された。その中で、indole と 3-methylindole (skatole)は、トリプトファンの細菌代謝に由来する²⁴。Indole/3-methylindole (I/S) および揮発性硫黄化合物 (VSC) は、口臭の2つの主要成分である。口臭は、主に舌のコーティングおよび歯周病によって引き起こされる²⁵。興味深いことに、被験者 A は、唾液供給期間内に歯周病を有していた。尿試料の PC1 スコアは、すべて正值であり、被験者間で一定の類似性を示した。被験者 D のみは、大きな日変動性を示した。



(a)

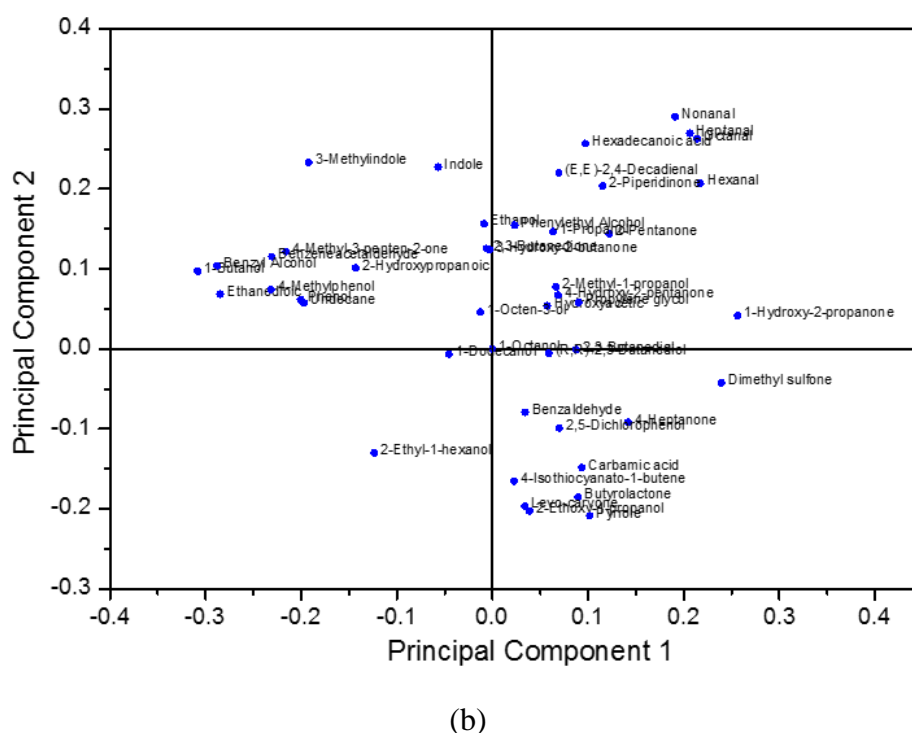


Figure 3.5. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from saliva and urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

3.3.6 がん患者唾液中 VOC 分析および健常者との比較

本研究で開発した ZSM-5/PDMS 複合膜抽出法によるヒト体液中 VOC 分析の有効性を証明するために、口腔がん患者の唾液中 VOC 分析を行い、これまでに得られた健常者唾液中 VOC 分子情報と比較した。直接にがん患者と健常者の唾液中 VOC 分子情報を比較することは、新規口腔がん VOC バイオマーカーの発見につながると考えられる。本研究は、まず手術を受ける前で入院中の舌がん患者 5 名の唾液を連続に三日間採取し、ZSM-5/PDMS-GC-MS 分析を行った。Table 3.3 に 5 名のがん患者の性別、年齢、がんの種類、サンプル数、服薬および既往歴を記入した。分析結果を Table 3.4 に示した。前述したように、がん患者および健常者唾液中の VOC 成分のそれぞれの出現頻度を計算し、比較を行った。また、がん患者と被験者の共通 VOC 成

分の t 検定を行い、 p -value で成分の有意性を調べた。Ethanol、2-pentanone、propanoic acid-2-hydroxy、ethanedioic acid、phenol、phenol-4-methyl、2-piperidinone および hexadecanoic acid の p -value が 0.05 以下でそれらの成分はがん患者と健常者の間で有意に変化したため、潜在的な VOC バイオマーカーであると考えられる。一方で、被験者において出現頻度が低く、がん患者において大きい VOC 成分は、2,3-butanedione、octanal、nonanal、2,3-butanediol、acetic acid-droxy、2-butanol-3-methyl、1,2-pentanediol、butanoic acid-butyl ester、1-dodecanol、1-hexadecanol および 1-hexen-3-ol などが存在する。一方で、逆に健常者と比べてがん患者の出現頻度が減少したのは、propanoic acid-2-hydroxy、ethanedioic acid、1-octen-3-ol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol、2-piperidinone および indole などが存在する。がん患者と被験者唾液中に含まれる VOC 分子は、大きな違いが存在することが ZSM-5/PDMS-GC-MS 分析によって明らかになった。

Table 3.3. Personal information such as the cancer type, age, etc. of the cancer subjects.

No.	性別	年齢	がん種類	サンプル数	喫煙歴	服薬	既往歴
1	女性		右側舌がん	3	×	なし	なし
2	男性	48	左側上顎歯肉がん、右側舌がん	3	○	なし	高血圧、アルコール依存症
3	男性	71	左側舌がん(T1N0M0)	3	×	ディオパン(高血圧)	胃がん術後(2011/3)大腸がん術後、狭心症(バイアスピリンは1月前から休薬)
4	女性	61	左側舌がん(T2N0M0/stage2)	3	×	なし	高血圧、高コレステロール
5	男性	40	右側舌がん(T2N0M0/stage2)	3	○	セレコックス(抗菌薬)	なし

Table 3.4. VOCs extracted from healthy subject and patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

No.	Compounds	Retention time, min	Selected ion, m/z	AF Healthy n=8	AF cancer n=5	p-value
1	Ethanol	6:19	31	1.00	1.00	0.0006
2	2,3-Butanedione	6:36	43	0.25	0.80	0.2
3	2-Pentanone	6:40	43	1.00	1.00	<0.00001
4	1-Propanol	7:27	31	0.88	1.00	0.1
5	Undecane	7:50	57	0.88	×	
6	Hexanal	7:56	44	0.13	×	
7	3-Penten-2-one, 4-methyl	8:40	55	0.13	×	
8	2-Furanmethanol, tetrahydro	8:57	71	×	0.20	
9	1-Butanol	9:01	56	0.75	1.00	0.4
10	Heptanal	9:24	43	0.13	×	
11	1-Butanol, 3-methyl	9:48	55	×	0.20	
12	Thiocyanic acid	10:41	73	×	0.20	
13	Octanal	10:58	41	0.13	0.60	0.2
14	2-Butanone, 3-hydroxy	11:07	45	1.00	1.00	0.3
15	Cyclohexanone	11:11	55	×	0.40	
16	2-Propanone, 1-hydroxy	11:19	43	0.75	0.80	0.6
17	Propylene glycol	11:23	45	×	0.20	
18	Propanoic acid, 2-hydroxy	11:30	45	0.75	0.40	0.001
19	5-Hepten-2-one, 6-methyl	11:35	43	×	0.40	
20	Ethyl ether	12:15	74	×	0.20	
21	2-O-Methyl-D-mannopyranosa	12:15	87	×	0.20	
22	Acetic acid, hydroxy	12:17	59	×	0.40	
23	Nonanal	12:27	57	0.38	1.00	0.8
24	Ethanedioic acid	12:30	59	0.63	0.20	0.007
25	2-Hexen-1-ol, (E)	12:36	57	×	0.20	
26	2-Decene, 8-methyl-, (Z)	12:49	55	×	0.20	
27	1-Decene, 8-methyl	12:52	70	×	0.20	
28	1-Hexen-3-ol	13:05	57	×	0.60	0.5
29	1-Octen-3-ol	13:10	57	0.88	×	
30	1-Heptanol	13:18	56	0.13	×	

31	1-Hexanol, 2-ethyl	13:44	57	0.38	0.20	
32	Benzaldehyde	14:25	77	0.13	0.20	0.5
33	2,3-Butanediol	14:27	45	0.38	0.80	0.9
34	1-Octanol	14:38	56	0.13	×	
35	2-Butanol, 3-methyl	14:59	45	×	0.40	
36	Butyrolactone	15:53	42	0.13	×	
37	Benzeneacetaldehyde	15:56	91	0.13	×	
38	1,3-Butanediol, (S)	16:46	43	×	0.20	
39	1,2-Pentanediol	17:15	55	×	0.40	
40	Hexanoic acid, 2-methyl	17:29	74	×	0.20	
41	2,4-Decadienal, (E,E)	17:54	81	0.13	×	
42	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy -2,4,4-trimethylpentyl ester	18:19	71	×	0.20	
43	Butanoic acid, butyl ester	18:25	71	×	0.40	
44	Benzyl alcohol	18:35	79	0.38	×	
45	4-Hexen-3-ol, 2-methyl-	18:35	71	×	0.20	
46	2-Furanmethanol, tetrahydro-	18:40	71	×	0.20	
47	Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1- (2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	18:41	71	×	0.20	
48	Phenylethyl alcohol	19:00	91	0.75	0.20	0.07
49	1-Dodecanol	19:23	55	0.13	0.80	0.2
50	2-Propenoic acid, oxybis (methyl-2,1-ethanediyl) ester	19:37	55	×	0.20	
51	Phenol	19:54	94	1.00	1.00	<0.00001
52	Methyl tetradecanoate	19:55	74	×	0.20	
53	Phenol, 4-methyl	20:33	107	0.38	0.20	0.006
54	1-Tetradecanol	21:27	55	×	0.20	
55	2-Piperidinone	21:34	99	0.63	0.20	0.006
56	Docosanoic acid	21:54	74	0.13	×	
57	Hexadecanoic acid	22:03	74	1.00	1.00	0.006
58	1-Hexadecanol	23:31	69	×	0.60	
59	Indole	24:52	117	0.75	×	
60	1H-Indole, 3-methyl-	25:34	130	0.25	0.20	0.7
61	n-Pentadecanol	26:31	69	×	0.20	

Figure 3.6 に、がん患者と健常者唾液中の共通 VOCs のピーク面積の比較結果を示す。共通成分の多くは、健常者よりがん患者唾液中の濃度が被検固体を問わず、低いことがわかった。

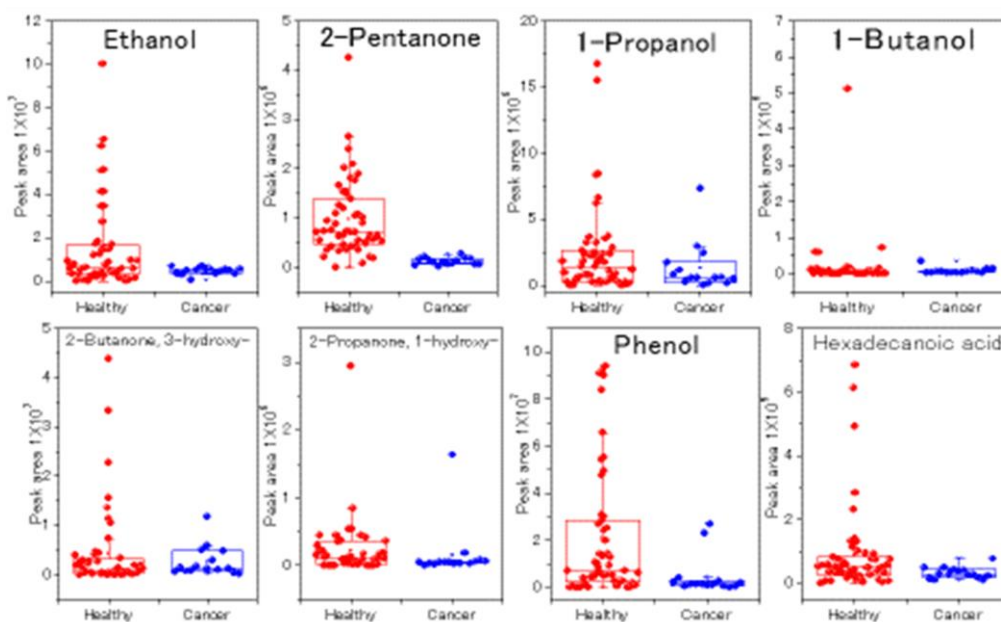


Figure 3.6. Comparison of average peak areas showing VOCs present in patient and healthy subject saliva after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.7 にがん患者と健常者の唾液から検出した VOCs 情報を利用し、主成分分析を行い、**Figure 3.7a** にスコアデータ、**Figure 3.7b** にローディングデータを示した。PCA スコアデータから、健常者は、PC1、PC2 の 0 付近に集中している。一方で、舌がん患者(2, 3, 4, 5)の多くは、健常者からかけ離れていることがわかる。がん患者の殆どは、唾液中 VOCs に基づいて健常者と識別できた。ステージ 2 の舌がん患者(4)は、ステージ 1 の被験者 1 と 2 と比べて健常者集団からより試料の性質が顕著に異なっていることが分かった。また、ローディングデータから、がん患者と健常者と区別できた要因(VOC 分子情報)を調べ、具体的な分子情報を **Figure 3.8** に示した。試料性質が最

も異なっている舌がん患者 3, 4 の唾液から他の舌がん患者より VOC 種類が著しく増加していることがわかる。以上から、唾液中 VOC 情報に基づき、舌がん患者と健常者の識別ができた。そして、がんステージと VOC パターンと一定の相関が確認された。

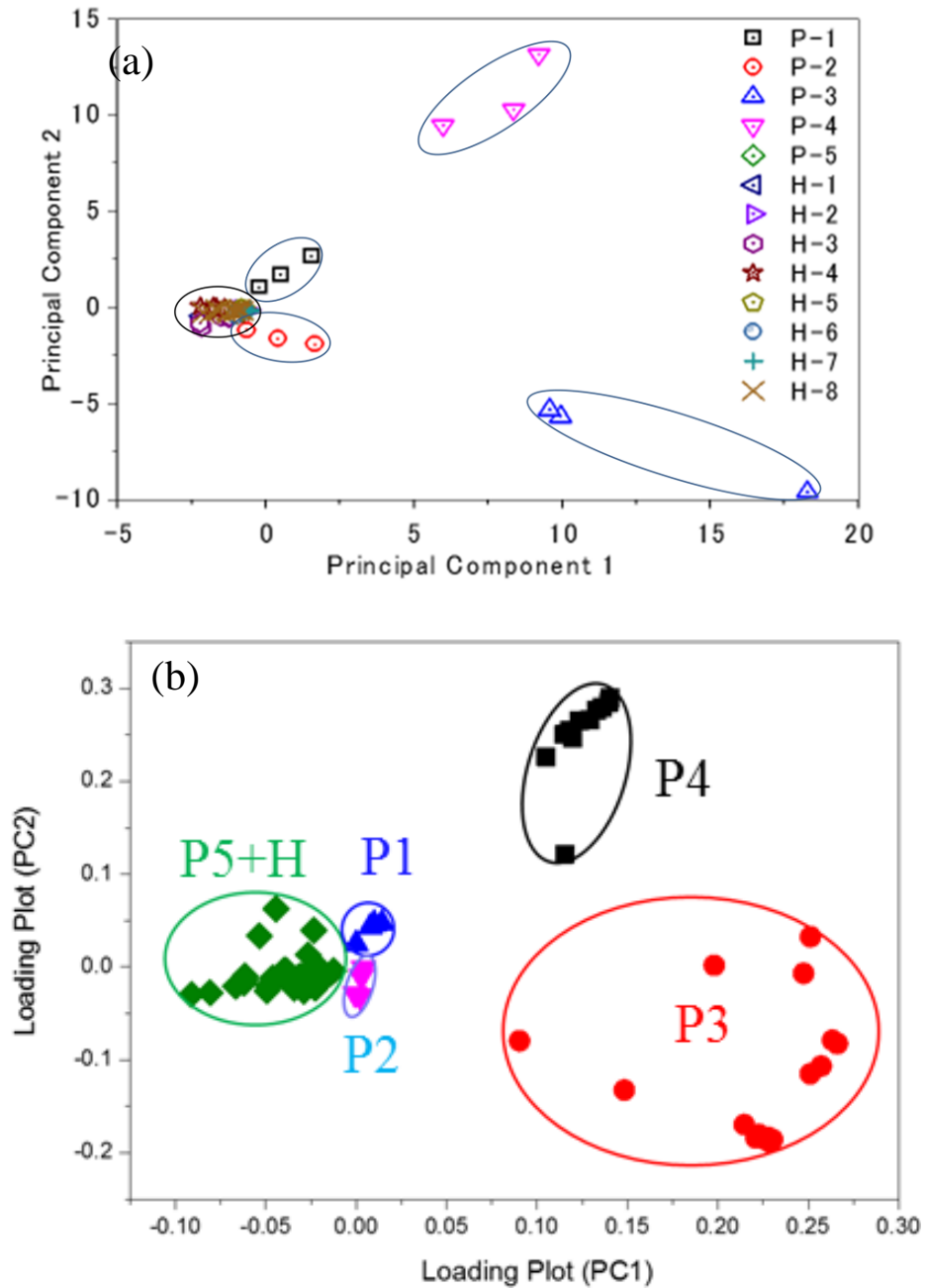


Figure 3.7. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

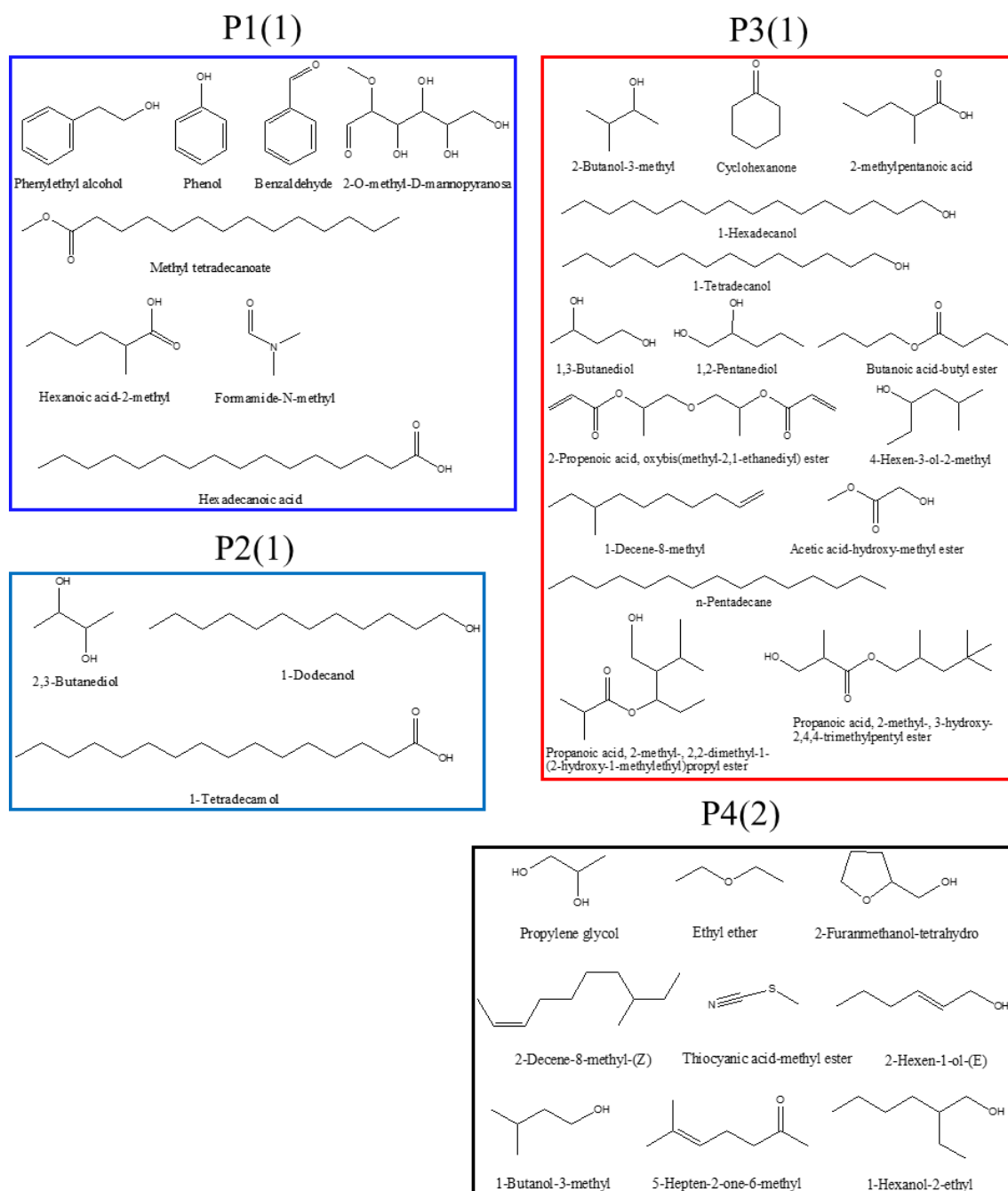


Figure 3.8. VOCs extracted from patient's saliva samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

3.3.7 連続的なヒト尿中 VOCs の分析

本研究は、20代の男性被験者2人の20日間連続的に朝の初尿および他の15人被験者の朝の初尿を採取し、ZSM-5/PDMSハイブリッド膜の抽出およびGC-MSの分析を行った。その結果を**Table 3.3**に示した。また、各化合物の検出率を計算し、それぞれのパーセンテージ値を追加した。Ethanol, 2-pentanone, undecane, 4-heptanone, 2-butanone-3-hydroxy, pyrrole, 2,3-butanediol, propylene glycol, ethanol-2-(hexyloxy), carbamic acid, butyrolactone, dimethyl sulfone, 2-(methylsulphonyl)propane, 2-piperidinone, docosanoic acid, dyclodecaneおよび2,5-Pyrrolidinedioneは、被験者二人の20日分のサンプルと被験者15人の15個のサンプルに90%以上の比率で検出された。以上の化合物は、被験者と尿の採取日を問わず、ヒト尿中の一般的なVOC代謝成分であり、日常の生活習慣、飲食、外気の暴露などの外因の影響を受けない。1-Butanolは、被験者Aから100%、グループから67%で検出されたに対して、被験者Bの尿からは、検出されなかった。2(3H)-Furanone, dihydro-5-methylは、被験者Bから84%、グループから53%で検出されたに対して、被験者Aの尿からは、検出されなかった。また、butyrolactone、phenol-4-methyl、2(3H)-furanone-dihydro-5-pentylは、被験者Aの尿から検出されなかった。被験者グループと比べ、ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)は、被験者AとBから検出された回数が少ないことがわかる。また、2人のうち1人からのみ得られるbenzaldehydeのような成分は、Cグループにおいても一部の人のみから検出された。成分の内因性と外因性の判断が困難である。

Figure 3.9 に示したように、被験者二人の連続尿の日間変動性を示した。例の20成分は、再現性よく検出可能な VOCs であるが、異なる日の同じ成分のピーク面積にはばらつきが見られ。ヒト尿中 VOCs の含有量は、一定の日間変動性を示すことが分かった。**Figures 3.10、3.11** には、同じ VOCs のピーク面積の被験者間の比較結果を示し

た。被験者グループの場合は、ピーク面積に比較的に大きいばらつきが見られた。それは、尿中 VOCs が個体依存性を示すことに起因する。

Table 3.5 Analysis of VOCs in urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

No.	Compounds	R.T	m/z	A	B	C
1	Ethanol	5:49	31	100%	100%	100%
2	2-Pentanone	6:09	43	100%	100%	93%
3	Undecane	7:16	57	100%	95%	87%
4	4-Heptanone	7:56	71	100%	95%	93%
5	1-Butanol	8:27	56	90%	0%	67%
6	2-Butanone-3-hydroxy	10:43	45	100%	74%	87%
7	Pyrrole	13:44	67	100%	100%	100%
8	Benzaldehyde	13:59	77	100%	63%	27%
9	2,3-Butanediol	14:23	45	100%	100%	100%
10	Propylene Glycol	14:37	45	85%	89%	93%
11	Ethanol, 2-(hexyloxy)	14:50	43	95%	95%	73%
12	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)	14:58	45	32%	0.35%	80%
13	Carbamic acid	15:07	44	100%	100%	100%
14	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl	15:08	56	0%	84%	53%
15	Butyrolactone	15:26	42	85%	89%	100%
16	Oxime-, methoxy-phenyl	16:18	133	70%	58%	73%
17	Levo-carvone	16:33	82	100%	100%	33%
18	Dimethyl sulfone	18:30	79	100%	100%	100%
19	2-(Methylsulphonyl)propane	19:17	43	95%	100%	87%
20	Phenol, 4-methyl	20:13	107	0%	100%	73%
21	2-Piperidinone	20:56	99	100%	100%	93%
22	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl	20:57	85	0%	63%	73%
23	Docosanoic acid	21:16	74	95%	100%	93%
24	Cyclodecane	22:15	55	100%	100%	100%
25	2,5-Pyrrolidinedione	24:15	99	100%	89%	100%

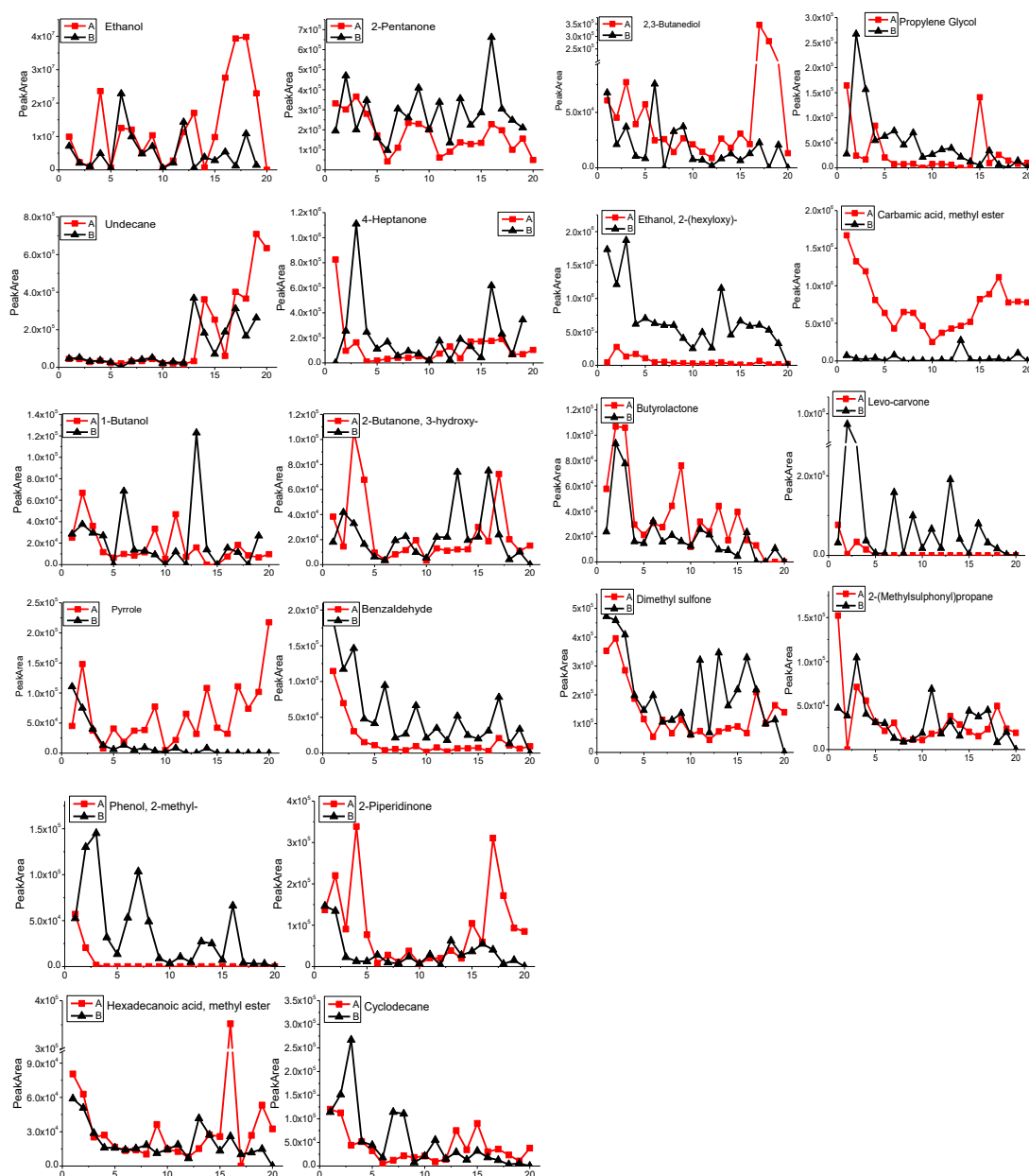


Figure 3.9 Daily variability of VOCs in human urine.

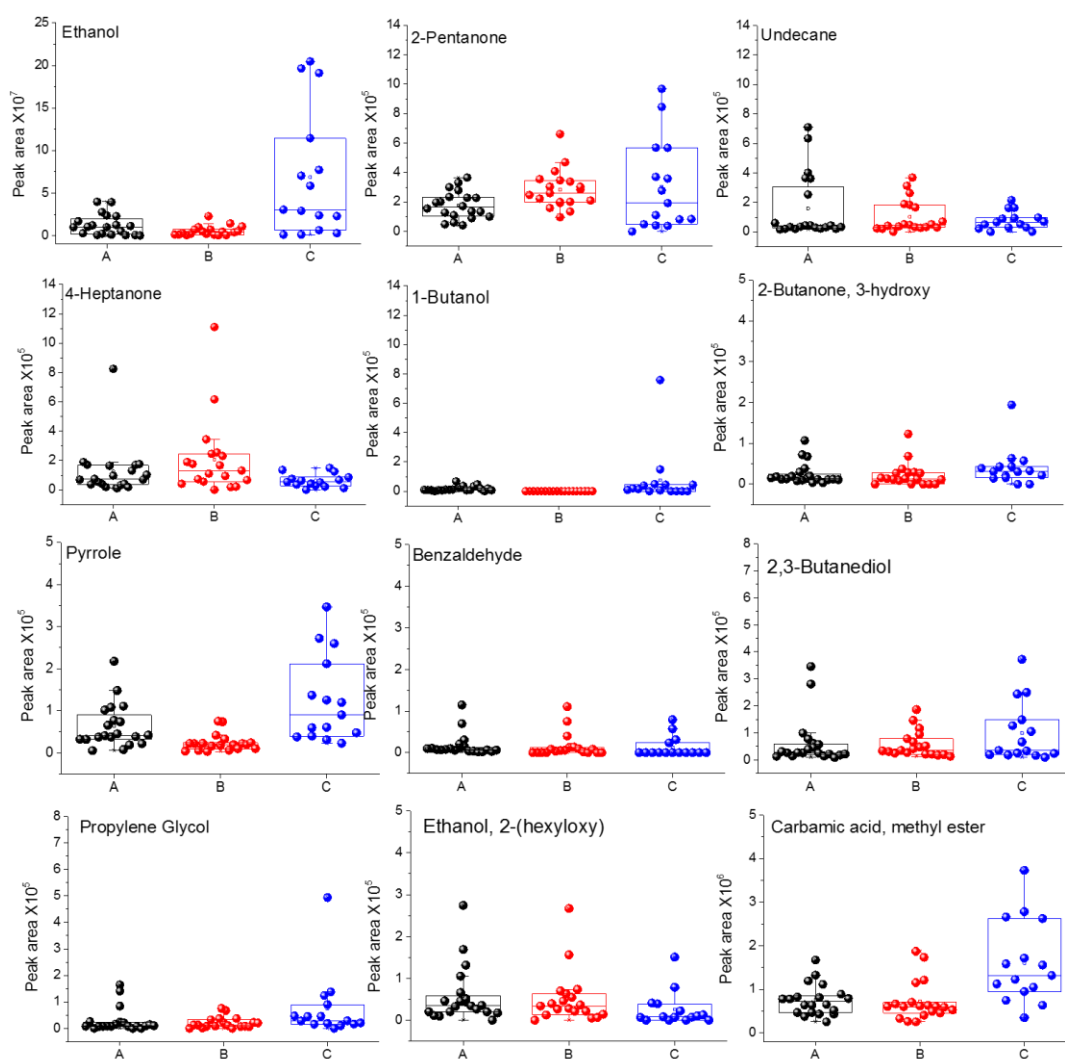


Figure 3.10. Comparison of peak areas present in urine of subject A, B and group (C) after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

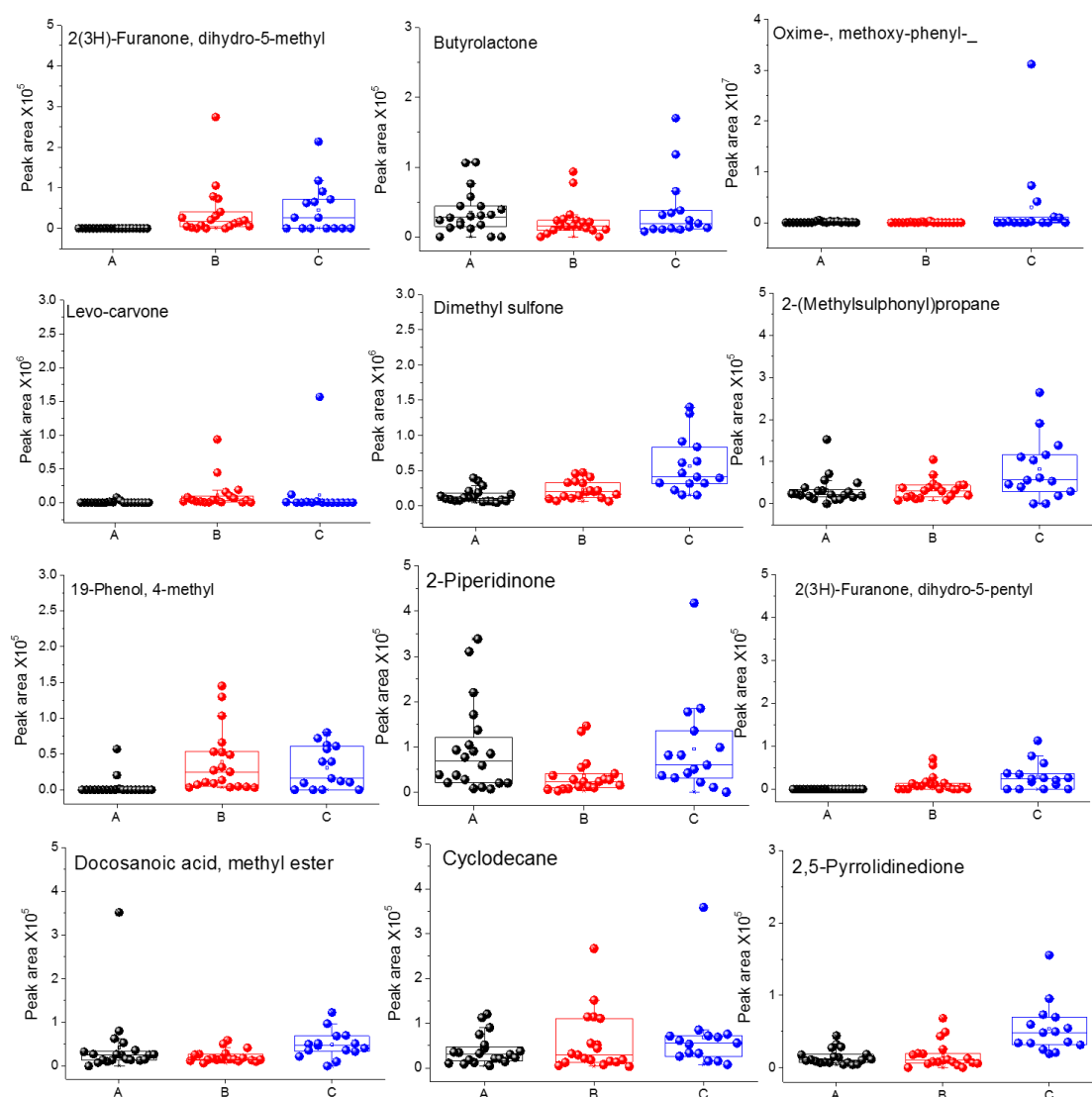


Figure 3.11. Comparison of peak areas present in urine of subject A, B and group (C) after TFME-GC-MS analysis using ZSM-5/PDMS hybrid film.

Figure 3.12 に尿サンプルの PCA 分析結果を示した。被験者 A と B のサンプルは、被験者個体内または二人の間で区別できなかった。つまり、**Figure 3.9** のように、日間変動性を示したものの、主成分分析では二人の尿中 VOCs が似たような性質を持っていることがいえる。一方で、被験者グループの場合は、比較的にスコア値の分布が広いことがわかる。尿の提供者数が増えるほど、尿中 VOC 分析の変動が多くなる。前述

したように、被験者の生活習慣または疾患は、唾液および尿中低分子揮発性代謝物を影響する。グループ被験者の場合は、A と B の二人の連続的な測定と比べ、事件者の尿中揮発性代謝物の性質が大きく異なることがわかる。その理由は、そこにあると考えられる。

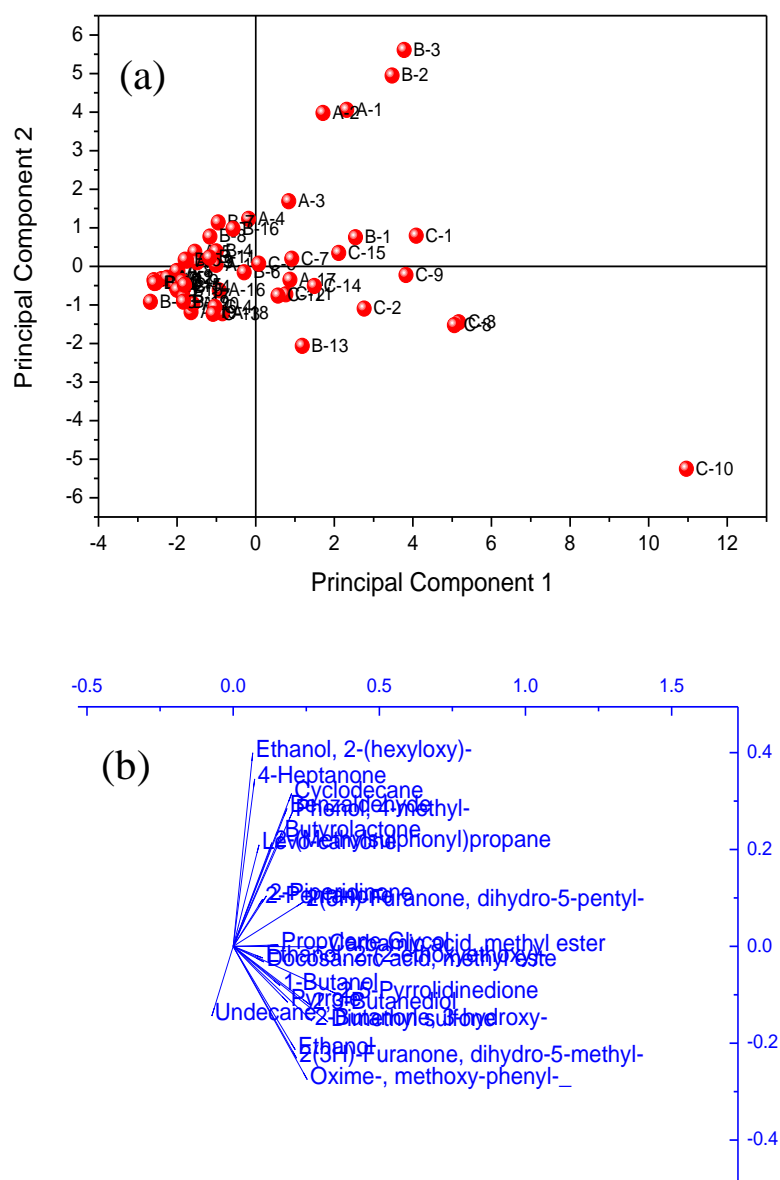


Figure 3.12. (a) Score and (b) loading plot of VOCs extracted from urine samples using a 20 wt% ZSM-5/PDMS hybrid film.

3.3.8 ヒト肺がん細胞およびヒト肺細胞の揮発性代謝物とヒト尿中代謝物との相関

ZSM-5/PDMS 複合膜を利用して、A549 および OUS-11 の細胞培養液から VOC 代謝成分を抽出して、GC-MS 測定を行った。Table 3.6 に示したように、A549 および OUS-11 の細胞培養液から 30 成分が検出された。再現性は、5 世代の連続培養によって確認した。特に、共通していない成分が確認されなかった。正常細胞と肺癌細胞の VOC の p -value は、Table 3.6 に示した。 p -value が 0.0001 以下の VOCs は、5 つであり、2-butanone-3-hydroxy、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol、phenol であった。その中で環状化合物が 4 つであった。他に、 p -value が 0.05 以下の成分(有意性のある成分)は、cyclohexanone、1-hexanol、cyclohexanol、acetophenone があつた。 p -value が 0.05 以下で A549 細胞と OUS-11 細胞を比較した時に、すべての共通 VOC 成分(2-butanone-3-hydroxy、cyclohexanone、1-hexanol、cyclohexanol、acetophenone、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol および phenol)の濃度が減少したのは、の 9 成分となった。 p -value は、5 世代を渡って培養した A549 細胞と OUS-11 細胞のすべてのデータを用いて統計分析を行った結果となる。VOCs の濃度は、細胞培養の世代間に一定の変動を示すため、統計的に比較することで肺がん細胞のバイオマーカーとなる最も可能性が高かつた成分に限定されてしまう可能性が感られる。そこで、単純に、同じ条件で培養した A549 細胞、OUS-11 細胞および DMEM 培地から検出した共通 VOCs の平均ピーク面積を比較することで主観的基準による VOC バイオマーカーの特定を行った。

比較実験は、同時に培養した A549 細胞、OUS-11 細胞および DMEM 後の培地を回収し、ZSM-5/PDMS 複合膜による抽出実験を行った。GC-MS 分析から得られた化合物のピーク面積を用いて各試料の比較を行った。肺がん細胞の A549 の平均ピー

ク面積と肺正常細胞の OUS-11 との相対ピーク面積比率を計算し、**Table 3.6** に示した。A549 と OUS-11 の間により変化が見られた化合物(差が 0.2 以上)を **Table 3.7** に示した。相対濃度が増加した VOCs は、2-pentanone、3-hexanol、1-butanol、propylene glycol、1-hexanol-2-ethyl、2,3-butanediol、1,3-Butanediol、hexanoic acid-2-methyl、1-tetradecanol、hexadecanoic acid、cyclohexane、carboxylic acid および docosanoic acid であり、減少した VOCs は、2-butanone-3-hydroxy、cyclohexanone、1-hexanol、benzaldehyde、acetophenone、acetic acid-3-methoxy-2-butyl ester、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol および phenol であった。

過去の報告による、直接に肺がんのバイオマーカーとなるのは、2-pentanone、1-hexanol-2-ethyl、2,3-butanediol、hexadecanoic acid、cyclohexane、2-butanone-3-hydroxy、cyclohexanone、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol および phenol の合計 10 成分となった。一方で、直接に肺がんマーカーではないものの、hexanoic acid-2-methyl は、乳がん[43,44]、1-tetradecanol は、子宮頸癌[45]、cyclohexanecarboxylic acid は、胃癌 54、過敏性腸症候群[55]、docosanoic acid は、胃癌[49]、結核[54]、1-hexanol は、メラノーマ(悪性腫瘍)[34]、acetophenone は、メラノーマ(悪性腫瘍)[34]、腺癌[42]、dimethyl sulfone は、メラノーマ(悪性腫瘍)[34]などのがんを始めとする疾患の VOC バイオマーカーとして報告されている。

更に、グループの被験者の尿中VOC (**Table 3.5**) と照らし合わせて、肺正常細胞および肺がん細胞と健康なヒトの唾液の共通VOC成分は、ethanol、2-pentanone、1-butanol、2-butanone-3-hydroxy、propylene glycol、benzaldehyde、2,3-butanediol、dimethyl sulfoneおよびdocosanoic acidがあった。特に、肺がん細胞培養において増加また減少(変化量が0.2以上の成分)を示したのは、2-pentanone、1-butanol、2-butanone-3-hydroxy、propylene glycol、benzaldehyde、2,3-butanediol、dimethyl sulfone およびdocosanoic acidであった。ヒト尿中からそれらの成分を分析することで、肺がんを

検査・診断できる可能性があると考ええる。

Table 3.6. List of the VOCs obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

No.	Compounds	Retention Time, min	Selected ion, m/z	^a PA _{OUS-11/} PA _{DMEM}	^b PA _{A549/} PA _{DMEM}	^c PA _{A549/} PA _{OUS-11}	^d p-value (OUS-11/ A549)	Variation (base on p-value)
1	Ethanol	5:58	31	1.15	1.10	0.96	0.73	
2	2-Pentanone	6:21	43	0.73	0.89	1.22	0.18	
3	3-Hexanol	6:46	59	12.28	14.31	1.66	0.73	
4	2-Propanol, 1-methoxy	8:42	45	0.94	0.91	0.97	0.44	
5	1-Butanol	8:45	56	0.89	1.13	1.27	0.84	
6	3-Hexanol	9:24	59	0.97	0.87	0.9	0.89	
7	Octanal	10:40	43	1.17	0.96	0.82	0.35	
8	2-Butanone, 3-hydroxy	10:52	45	1.62	1.00	0.62	< 0.0001	↓
9	Cyclohexanone	10:57	55	1.14	0.69	0.61	0.022	↓
10	Propylene glycol	11:10	45	0.63	0.99	1.57	0.29	
11	1-Hexanol	11:37	56	1.69	0.86	0.51	0.0016	↓
12	Nonanal	12:12	57	1.69	1.39	0.82	0.16	
13	Cyclohexanol	12:26	57	1.092	0.93	0.85	0.0033	↓
14	1-Hexanol, 2-ethyl	13:28	57	0.41	2.088	5.092	0.49	
15	Benzaldehyde	14:06	77	0.43	0.25	0.58	0.086	
16	2,3-Butanediol	14:48	45	1.086	1.47	1.35	0.86	
17	Acetophenone	15:50	105	1.048	0.60	0.57	0.022	↓
18	Acetic acid, 3-methoxy -2-butyl ester	16:13	59	4.49	3.62	0.81	0.26	
19	1,3-Butanediol	16:36	45	1.31	1.59	1.21	0.70	
20	Benzenemethanol, a-methyl	17:31	79	1.57	1.76	1.12	0.95	
21	Benzyl alcohol	18:15	79	3.96	1.016	0.26	< 0.0001	↓
22	Dimethyl sulfone	18:32	79	1.28	0.96	0.75	< 0.0001	↓
23	Phenylethyl alcohol	18:40	91	7.14	1.057	0.15	< 0.0001	↓
24	1-Undecanol	19:09	69	0	0	0	0	
25	Phenol	19:34	94	1.30	0.78	0.6	< 0.0001	↓
26	Hexanoic acid, 2-methyl	19:48	74	0.81	0.99	1.22	0.90	
27	1-Tetradecanol	21:16	69	0.34	1.18	3.47	0.49	

28	Hexadecanoic acid	21:48	74	0.98	1.23	1.26	0.35
29	Cyclohexanecarboxylic acid	22:18	129	0.40	0.95	2.38	0.50
30	Docosanoic acid	23:59	74	0.86	1.11	1.29	0.064

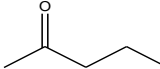
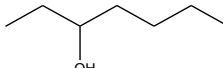
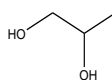
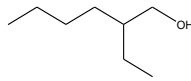
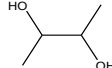
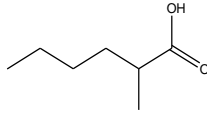
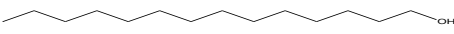
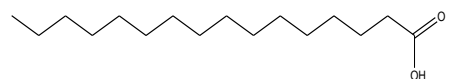

※a: OUS-11 細胞 5 世代培養後に得られた各 VOCs の平均ピーク面積と同じ条件下で培養した DMEM 培地中の同 VOC 成分のピーク面積との比率

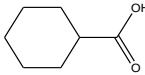
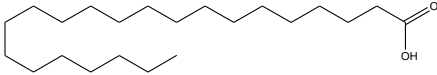

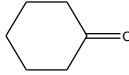
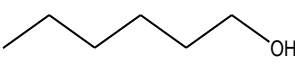
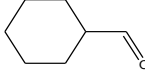
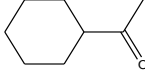
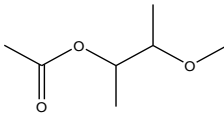
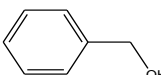

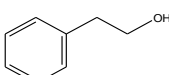
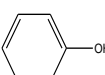
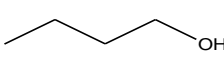
※b: A549 細胞 5 世代培養後に得られた各 VOCs の平均ピーク面積と同じ条件下で培養した OUS-11 細胞培地（5 世代）中の同 VOC 成分のピーク面積との比率

※c: A549 細胞 5 世代培養後に得られた各 VOCs の平均ピーク面積と同じ条件下で培養した DMEM 培地中の同 VOC 成分のピーク面積との比率

※d: *p* 検定は、OUS-11 細胞と A549 細胞間で行われた結果である。

Table 3.7. List of the VOCs biomarkers obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

compounds	structural	disease
2-pentanone		Lung cancer ^{32,34}
3-hexanol		
propylene glycol		
1-hexanol-2-ethyl		Lung cancer ^{32,35,36,37}
2,3-butanediol		Lung cancer ^{40,41}
hexanoic acid-2-methyl		Breast cancer ^{43,44}
1-tetradecanol		Cervical carcinoma ⁴⁵
hexadecanoic acid		Lung cancer ^{47,48} Gastric cancer ⁴⁹ Breast cancer ⁵⁰
cyclohexane		Lung cancer ^{42,51} Tuberculosis ^{52,53}

cyclohexanecarboxylic acid		Gastric cancer ⁵⁴ Irritable bowel syndrome ⁵⁵
docosanoic acid		Gastric cancer ⁴⁹ Tuberculosis ⁵⁴
2-butanone-3-hydroxy		Lung cancer ³² Melanoma ³⁴
cyclohexanone		Lung cancer ^{32,35,36}
1-hexanol		Melanoma ³⁴
benzaldehyde		Liver cancer ³⁸ Skin cancer ³⁹
acetophenone		Melanoma ³⁴ Adenocarcinoma ⁴²
acetic acid-3-methoxy-2-butyl ester		
benzyl alcohol		Lung cancer ⁴⁶ Melanoma ³⁴ Skin cancer ³⁹
dimethyl sulfone		Melanoma ³⁴
phenylethyl alcohol		Lung cancer ⁴⁰ melanoma ³⁴
phenol		Lung cancer ^{40,56} Breast cancer ⁴³ Melanoma ³⁴
1-butanol		Lung cancer ^{57,58,59}

本研究で発見した肺がんの潜在的な VOC バイオマーカーは、既に多くの他の研究報告によってがんなどの疾患のバイオマーカーとして報告された(**Table 3.7**)。Chen らは、1-butanol は、肺癌細胞の代謝産物であり、肺癌細胞の全ての培養培地に存在す

ることが見出され、肺癌のマーカーとして見る事ができる[57]。Schallschmidt らは、肺癌患者 37 名と健康なボランティア 23 名の呼気分析を行い、肺癌患者の呼気には、aldehydes、2-butanone および 1-butanol のような酸素化された VOCs の濃度が有意な増加を示した[58]。Song らは、肺癌患者 43 名の呼気分析から 68 から 114 の VOCs を検出したが、健康なヒト呼気と比較したところ、1-butanol と 3-hydroxy-2-butanone は、肺癌患者の呼気から多く検出され、肺癌のバイオマーカーであることを報告した[59]。1-Butanol は、肺癌バイオマーカーの探索のための *in vitro* と *in vivo* 実験の両方から肺癌バイオマーカーとして同定された。A549 細胞と OUS-11 細胞の共通成分のピーク面積の比較を **Figure 3.13** に示した。すべての成分において、OUS-11 よりがん細胞である A549 はピーク面積が低いことがわかった。更に、PCA 解析によって OUS-11 と A549 細胞の違いを説明された(**Figure 3.14**)。Hakim らは、がん細胞の *in vitro* 実験では aldehyde 類、アルコール類、ketone 類、esters 類など化合物の減少を報告した (Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways)。肺癌細胞の VOC 代謝には、増加成分と減少の両方が関与していることがわかる。

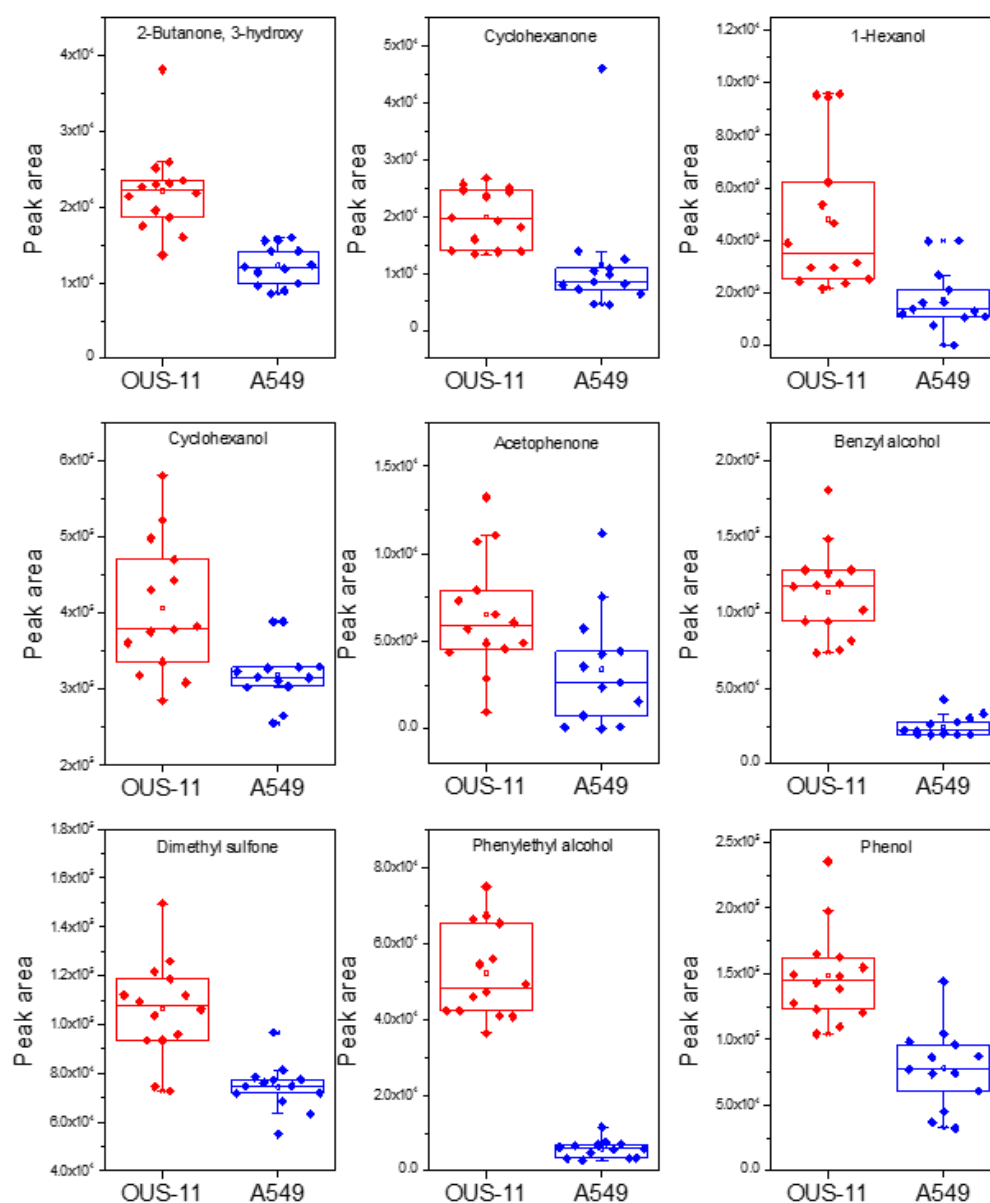


Figure 3.13. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of A549 and OUS-11 cell lines via ZSM-5/PDMS hybrid bottle film extraction.

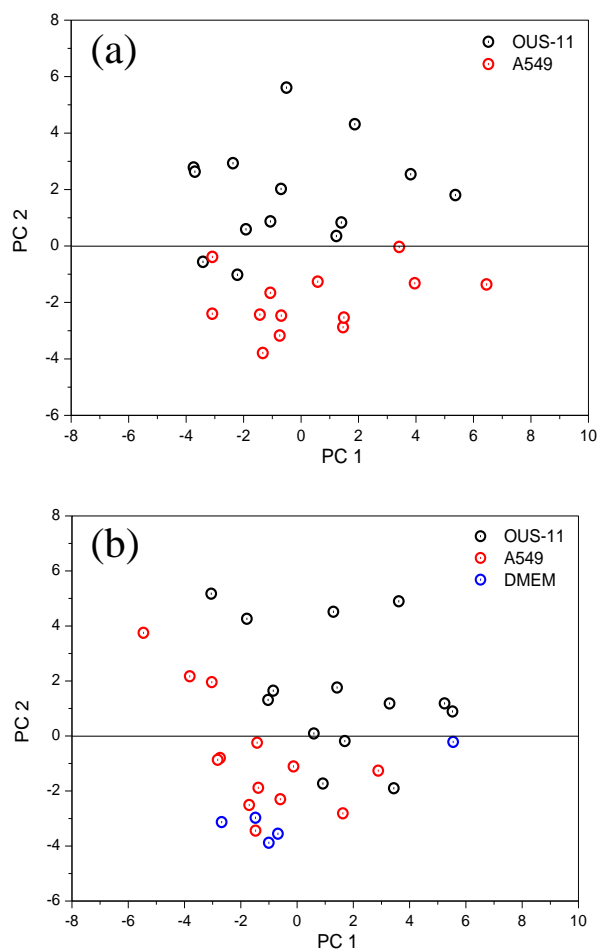


Figure 3.14. PCA analysis of VOCs metabolic components of (a) A549 and OUS-11 cell lines and (b) A549, OUS-11 cell lines and DMEM via ZSM-5/PDMS composite thin film.

細胞培養における VOC バイオマーカーの探索は、同じ部位の正常細胞とがん細胞の比較が必要となる。肺がんに関しては、A549 細胞と OUS-11 細胞の足棒培養における VOC 代謝の違いを探索するか、または、がん患者または健常者の呼気中に含まれる VOCs の違いを探索するかの二つの手段がある。一方で、特にがん細胞培養のような *in vitro* 研究では、研究室の実験条件に制限され、正常細胞との比較ができないケースは少なくはない。そこで、同じ条件で培養した細胞培養培地が比較対象になるとせざるを得なくなる。そこで、正常細胞の代わり

に DMEM 培地ががん細胞の比較対象になり得るのかを検討する必要がある。例えば、下に示したように、VOCs がバイオマーカーとなる条件を設定する。肺正常細胞 (OUS-11) の連続継代から得られた VOCs の平均ンピーク面積を PA_{OUS-11} にし、同様に肺がん細胞 (A549) および DMEM 培地の平均ピーク面積をそれぞれ、 PA_{A549} と PA_{DMEM} に設定する。そこで、3 種類の試料間の比較を行い、 PA_{OUS-11} と PA_{DMEM} の比率を α に、 PA_{A549} と PA_{DMEM} の比率を β に定義する。仮に、 PA_{DMEM} の値を基準として、1 に定義すると、 PA_{A549} が 1 より、つまり、 PA_{A549} が PA_{DMEM} より大きく、 PA_{DMEM} が PA_{OUS-11} よりも大きい場合は、それに当てはまる VOCs は、肺がん細胞培養において排出された成分であると考えられる。逆に、 PA_{OUS-11} が 1 より、つまり、 PA_{OUS-11} が PA_{DMEM} より大きく、かつ、 PA_{A549} が PA_{DMEM} よりも小さい場合は、その VOCs は、肺がん細胞培養において消費された成分であると考えられる。本研究で定義した基準で肺がん細胞となり得る VOC バイオマーカーは、排出成分: 1-butanol、1-hexanol-2-ethyl、2,3-butanediol、1-tetradecanol、hexadecanoic acid および docosanoic acid (**Table 3.6 の赤文字**) であり、消費成分: octanal、2-butanone--hydroxy、cyclohexanone、1-hexanol、cyclohexanol、acetophenone、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol および phenol (**Table 3.6 の青文字**) であった。従って、本研究の ZSM-5/PDMS 複合膜による肺がん細胞培養からの VOC バイオマーカーの分析は、信頼性が高く、比較用の正常細胞が欠ける研究にも適用できるといえる。

$$\frac{PA_{OUS-11}}{PA_{DMEM}} = \alpha \quad \frac{PA_{A549-11}}{PA_{DMEM}} = \beta$$

$$PA_{DMEM} = 1, \quad PA_{OUS-11} = \alpha, \quad PA_{A549-11} = \beta$$

バイオマーカーとなる条件:

$$PA_{OUS-11} = \alpha \leq PA_{DMEM} = 1 < PA_{A549-11} = \beta \quad \text{排出成分}$$

$$PA_{OUS-11} = \alpha > PA_{DMEM} = 1 \geq PA_{A549-11} = \beta \quad \text{消費成分}$$

3.4 結論

本研究では PDMS/ZSM-5 複合膜に基づいた TFME と GC-MS の組み合わせによる唾液または尿中 VOC 成分の分析を試みた。健常者 8 名の唾液と 6 名の尿の分析から、良好な日間再現性を示した 34 と 33 成分の VOCs がそれぞれ特定できた。PDMS ポリマーと多孔性の ZSM-5 ゼオライトを複合した抽出膜は従来の SPME ファイバーと比べ、抽出容量(膜の面積やボリューム)や膜安定性に優れ、少ないサンプル量に含まれた微量の VOCs を感度よく分析することができた。また、同一被験者から連続して採取した生体試料の分析により、日常生活などの外的要因に大きく影響されない VOCs の化学情報が抽出可能であった。唾液と尿中の VOCs は、アルコール、有機酸、アルデヒド、ケトン、フェノール、エーテル、ヘテロ環化合物、有機硫黄化合物と多様である。人によって唾液または尿中の官能基別の VOCs の割合が大きく異なることがわかった。更に、舌がん患者 5 名の 3 日間唾液試料の分析によって、健常者と比較して、Ethanol、2-pentanone、propanoic acid-2-hydroxy、ethanedioic acid、phenol、phenol-4-methyl、2-piperidinone および hexadecanoic acid は有意性を示した。また、がん患者と健常者の唾液中 VOC の良好な日間再現性を示し、18 成分が増加または減少していることが分かった。唾液分析を利用して、健常者からがん患者の識別が可能であった。

また、ZSM-5/PDMS 複合膜の抽出と GC-MS との組み合わせた VOC 分析手法は、肺の正常細胞と肺がん細胞における低分子代謝成分を高感度に分析できた。肺正常細胞と肺がん細胞の間に有意に変化した成分 (p -value が 0.0001 以下) は、2-butanone-3-hydroxy、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol、phenol の 5 成分となった。その中で環状化合物が 4 つであった。他に、 p -value が 0.05 以下の成分(有意性のある成分)は、cyclohexanone、1-hexanol、cyclohexanol、acetophenone があった。グループの被験者の尿と肺がん細胞には、ethanol、2-pentanone、1-butanol、2-butanone-3-hydroxy、propylene glycol、benzaldehyde、2,3-butanediol、dimethyl

sulfone および docosanoic acid が共通成分として同定された。そのため、ヒト尿中の VOC 分析は、肺がんを検査・診断できる可能性があると考ええる。本研究の ZSM-5/PDMS 複合膜による肺がん細胞培養からの VOC バイオマーカーの分析は、信頼性が高く、比較用の正常細胞がなくても適用できるといえる。

本研究の分析手法は体内の代謝に深く関わる多くの VOCs の検出に有用であった。将来的には患者の唾液または尿の分析を通して、高い疾患相関を示す新規バイオマーカーの発見が期待できる。

第 4 章

生体 VOC と疾患相関の解明: ヒト子宮頸がん細胞株 (HeLa) 培養における VOC バイオマーカーの探索

4.1 緒言

ゲノミクス、プロテオミクス、バイオインフォマティクス、そして近年話題となったメタボロミクスとメタボノミクスは、疾患の原因と遺伝的変動との相互作用と相互関係を理解するのに役に立つ[1]。特に、近年では、尿およびプラズマなどの体液中の小分子代謝物 (分子量が 1 kDa 以下) を様々な分光法を用いて分析し、更に、定量化することができ、代謝表現型の情報を提供し、個別化医療や公共医療に適用することができる[2]。最も有望なメタボロームアプローチの一つは、VOCs の分析である。実は、VOCs と疾患の相互関係および VOCs による疾患の早期発見は、すでにいくつかのレビュー論文によって解説されている[3-6]。

VOCs は、人間の呼気、血液、皮膚の発散、尿、汗、唾液などに含まれている[7]。健常人の呼気中は、874 種類の VOCs が存在し、人体から発する VOCs の約半分を占める[7]。In vivo 研究における人体から発する VOCs のモニタリングは、疾患の状況を理解するのに、非侵襲的、迅速かつ潜在的に安価な方法である。例えば、呼気中の VOC 分析は、肺がん[8-10]と乳がん[11,12]の早期発見方法として報告されている。Haick らは、177 人のボランティアの呼気を金ナノ粒子のナノセンサーによって分析し、GCMS-SPME の結果を交えて比較を行った。結果として、ナノセンサーは、肺、乳房、結腸直腸および前立腺癌の検出に成功した[13]。更に、呼気分析の臨床的関連性を強化するために、Filipiak らは、腫瘍組織と健常な組織またはがん患者の呼気と健常者の呼気の異なる供給源に属する VOCs を GC-MS で分析し、ethanol と octane が肺癌のバイオマーカーである可能性を見出した[10]。

一方で、従来の腫瘍検査方法は、広範な検査が必要、高いコスト、腫瘍を見逃す問題点がある。また、ほとんどの癌における特徴的な早期の臨床症状が欠如し

ているために、現有の検査方法が確実に癌の早期発見できるとの保障がつかない。犬の嗅覚が癌の診断に役に立つ可能性が 1989 年に初めて報告された。2006 年に Mcculloch らは、二週間ほど飼い犬に肺癌及び乳癌患者の呼気を健常者の呼気と区別する訓練を行い、肺癌に対する感度、特異性が共に 99%に、乳癌には感度が 88%、特異性が 98%に達した[14]。Angle らは、ウイルス性下痢ウイルス感染細胞の培養物中の VOCs で犬を訓練し、リアルタイムの下痢ウイルスの検知に成功している[15]。しかし、犬は、癌ではなく、癌に関わる炎症、感染または壊死に起因する臭気を検出する可能性もあると指摘されている。犬の訓練の煩雑さでこの方法が疾患検査に適用しているとは言いがたい。最近、線虫は、人間の尿の匂いを嗅ぎ分けて、がんを検出できると報告されたが、その匂い成分について明確に言及していない[16]。

我々は、VOC ベースのバイオマーカーによる疾患診断および早期発見の際、優れた VOCs の分析方法の開発あるいは臨床関連性の高い VOC バイオマーカーの発見の両方を達成するために、先端的抽出材料、精密な分析機器、多様な VOC 供給源(in vivo と in vitro を含む)、高感度検知デバイスなど様々な研究分野の統合が不可欠であることに気付いた。そこで、in vivo と in vitro 環境における VOCs の代謝プロファイルを解明することがその第一歩になると考える。

GC-MS は、メタボローム(VOCs)の解析方法として、比較的安価で再現可能、高い感度の利点を持っているが、試料準備に要する時間の長さが弱点である[2]。その問題の克服対策として、固相マイクロ抽出法(SPME)は、抽出時間を短縮し、VOCs の分析にこの方法を適用することが容易にする[17]。ヘッドスペース (Head Space, HS) 法は、SPME の最も典型的な抽出手法である[18]。HS-SPME は、環境、食品、産業、バイオなどの分野で利用され、VOC の分析にとって最も一般的な手段である[19]。例えば、Lavra らは、乳がん細胞 in vitro 実験の headspace

から 13 種類の潜在的なバイオマーカー分子の同定ができた[11]。Hanai らは、A549 細胞の培養液と腫瘍を有するマウス尿中の dimethyl succinate, 2-pentanone, phenol, 2-methylpyrazine, 2-hexanone, 2-butanone, acetophenone が共に増加していることがわかった[20]。Zhang らは、胃癌細胞(MGC-803)と胃粘膜細胞(GES-1)の GC-MS-SPME 分析によって、3-octanone と butanone が胃がん細胞の代謝成分であることを報告した[21]。しかし、SPME による VOCs の抽出は、まだいくつかの課題が残っている。SPME による水溶液からの VOC 抽出は、揮発性または無極性化合物が半揮発性または極性化合物より早く抽出される。また、抽出された VOCs は、SPME 抽出ファイバーの限られた吸着材容積によって、吸着材に残留する可能性が高い[22]。その他に、HS-SPME/GC-MS の問題点は、分析試料によって SPME による VOCs の吸着時間が長いこと[23]また要する試料の多さ(数百 mL レベル)[20,24]が挙げられる。

近年、TFME は、抽出相の体積と表面積、熱・化学的安定性、高い気孔率などの利点から、従来の SPME 法より高い VOC 抽出効果と感度を提供する。Reyes-Gares らは、親水性-親油性にバランスの取れたポリアクリロニトリル系の抽出薄膜を開発し、血液や尿中 VOCs の分析を行った[25]。Bessonneau らは、同様な抽出方法を唾液中の VOC 分析に展開した[26]。両方とも TFME 薄膜の大きい表面積の利点を利用して高感度の VOC 分析を可能にしている。Jiang らは、PDMS のメンブレンサンドイッチ抽出膜を使用して、皮膚の揮発ガスの TFME-GCMS 分析を行い、臨床および法医学捜査分野での応用可能性を示した[27]。Kermani らは、典型的な SPME の抽出材料である Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)膜と polydimethylsiloxane/divinylbenzene(PDMS/DVB)膜をスピンコーティングで作製し、水中の極性 VOCs の迅速かつ効率的な薄膜抽出を実現した。膜の厚さは、スピンコーティングによって容易に制御できた[28]。

本研究では、従来から固相抽出に多く用いられているジメチルポリシロキサン(以下、PDMS)吸着マトリックスにゼオライトの一種である ZSM-5 をハイブリッドした吸着デバイスの GC-MS 分析に基づき、HeLa 細胞培養に伴う VOC 代謝成分の分析を試みた。本研究の特徴としては、HeLa 細胞を長周期に培養し、新鮮な培養培地およびインキュベーターにて培養した培養培地との比較で細胞代謝成分をプロファイリングし、代謝成分の世代間再現性を確認した。また、ZSM-5 は、熱化学的安定性や熱伝導率などの優れた性質を有し、ガスと液体の分離に使用される[29,30]。PDMS と ZSM-5 を複合化することによって両方の吸着特性を最大に活用することができる。

4.2 実験項目

4.2.1 使用試薬

ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ モル比 = 30, Lot: 110421)は、JGC Catalysts and Chemicals Ltd から購入した。PDMS 溶液キット(Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit)を Dow Corning Ltd から購入した。ベース溶液(Sylgard 184A)と硬化剤溶液(184B)は 10:1 の比率で混合し、PDMS ポリマーを製造した。Methanol は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd から入手した。実験に用いた化合物は全て分析等級であり、更に精製することなく使用した。脱イオン純水($18.3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)はイオン交換および濾過(ミリポア、direct QTM)に続いて逆浸透によって得た。

4.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製

容量が 50 mL のガラスサンプル瓶を ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の支持体として使用した。PDMS モノマーに対して重量比が 20 wt%になるように ZSM-5 を

加えて均一に混ぜ、1.0 g の混合試料をサンプル瓶の底に垂らし、室温で 3 日間静置し、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を硬化させた。更に、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を 100 °C の乾燥機の中で 1 時間熱処理を行った後、メタノールを振とうさせながら 3 日間複合膜の洗浄を行った。同様に ZSM-5 を添加していない PDMS 単体膜を作製して ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜との比較に用いた。

4.2.3 HeLa 細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞(理研 CELLBANK RCB0007)は、RIKEN CELLBANK, japan から入手した。細胞培養培地は、高グルコース DMEM 培地 (Dilbecco's modified Eagle medium, 4.5 g/L, 6.0 mL, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) を使用した。具体的に、ウシ胎児血清(FCS, Biowest France Nuaille) 10%, ペニシリン(100 U/mL)、ストレプトマイシン(100 mg/mL)、グルコース(PSG) 1%を混合して使用した。HeLa 細胞を含む DMEM 培地から適量取り出し、DMEM 培地 6 ml を含む直径が 10 cm のプラスチックシャーレへ 1×10^5 cells/dish となるように HeLa 細胞を播種した。HeLa 細胞培養は、37°C で 95% の空気と 5% の CO₂、96 時間ウォータージャケット型インキュベーター内で培養した。96 時間後、細胞の継代を行った。初めに、PBS (pH 7.2 リン酸バッファー溶液) と Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin-EDTA 100 mL, GIBCO-25300-054) を湯浴にて 37°C に温めた。滅菌済み 10 mL ガラスピペットで、培地を取り除き、5 mL ガラスピペットで PBS を 3 mL シャーレに加え軽く揺すり、細胞を洗浄した。これを 2 回行った後 PBS を取り除き、Trypsin-EDTA を 1.0 mL 加え、シャーレをインキュベーター内に 5 分間戻し、細胞をシャーレ底面から剥ぎ取った。その後、シャーレ円状にピペッティングを行い、細胞の塊をほぐした。DMEM 培地 1 mL を加え、良く馴染ませた後、15 mL チューブへと移し 13 mL にメスアップした。それを 1000

rpm、3 分遠心分離機にかけて分離し、上澄み培地を取り除き、新たな DMEM 培地 2 mL を加えた。セルカウンタープレートを用いて、細胞数を計算し、 1×10^5 cells/dish となるように、培地 6 mL が入った新たなシャーレへ細胞を播種した。このように、観察、培地交換、継代を繰り返して、細胞の管理を行った。96 時間後に培地交換を行ったものを GC-MS 測定試料とした。また、培地交換の際に、DMEM 培地のみを入れたシャーレをブランクとして同様にインキュベーター内へ設置した。比較のために、HeLa 細胞なしの DMEM 培養を同じ培養手順に従って 96 時間培養した。

4.2.4 サンプルングと分析

HeLa 細胞を 96 時間培養した後の DMEM の抽出は、マルチシェーカー(EYELA, FMS-1000, Tokyo Rikakikai, Co., Ltd).を用いてを 200 rpm で連続的に攪拌して行われた。HeLa 細胞を含まない培養培地をインキュベーターから取り出した直後の TFME 分析に使用した。各世代の HeLa 細胞は、5 mL の HeLa 細胞培養培地を用いて三回繰り返してサンプルングを行った。抽出温度は、マルチシェーカー内部温度(30°C)を採用した。DMEM 培地 5 mL を ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜修飾サンプル瓶(膜総重量が 1.0 g、サンプル瓶サイズが 50 mL)に入れ、3 時間振動下で抽出を行った。抽出後、水溶液サンプルを捨て、水洗浄と窒素乾燥を行った。更に、VOCs の脱離は、メタノール(100 μ L), 30 °C で 30 分間行った。最後に、メタノールサンプルを 1.0 μ L 取り、GC に注入した。新鮮な DMEM 培地および無細胞培養 DMEM 培地の抽出分析も同じ手順で行った。

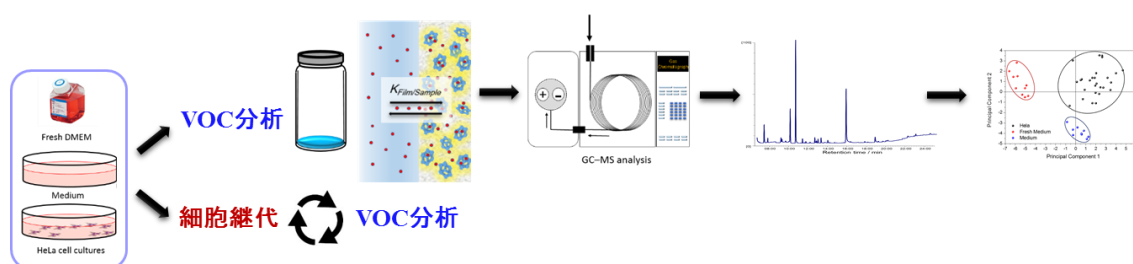


Figure 4.1. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via ZSM-5/PDMS composite thin film.

4.2.5 GC-MS 測定条件

GC-MS 測定は、それぞれ、JMS-Q1000GC (JEOL, Japan)と Agilent 7890A のを 70 eV 電子イオン化 (EI) モードで行った。GC-MS は JMS-Q1000GC(JEOL, Japan) を用いた。カラムは DB-WAX(ポリエチレングリコールベースの高極性固定相、内径 0.25 mm、吸着層厚み 0.5 μm 、長さ 30 m)を用いた。GC 注入口の温度は 230 $^{\circ}\text{C}$ でキャピラリーカラムの温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間、10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 230 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、10 分間保持して測定した。キャリアガスは超高純度ヘリウムガス(純度 99.999%)を 1 mL/min の速度で流した。測定は Splitless モードで行った。MS 設定については動作条件が電子衝突イオン化モードで 70 eV とした。イオン源および GC インタフェースの温度はそれぞれ 200 $^{\circ}\text{C}$ および 230 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。データ解析はフルスキャンモードで($m/z=25\sim 310$)、スキャンタイム 0.3 秒で行った。同定は National Institute of Standards and Technology (NIST)マススペクトルライブラリーサーチ(JEOL version 1.5)ソフトウェアを用いた。

4.3 結果と考察

4.3.1 GC-MS 分析による細胞培地中の VOCs の分析

細胞の最大の代謝を決定するのに細胞の数は重要な因子である[31]。細胞数の増加と共に代謝成分の濃度変化が顕著になることが予測できる。培養中の HeLa 細胞の実態顕微鏡写真に基づき、最初 1×10^5 cells/dish の細胞が 4 日間(約 96 時間)培養し、細胞がコンフルエントに近いまで増殖し、細胞数の最大値が得られた(**Figure 4.2**)。HeLa 細胞の実態顕微鏡の撮影 1 によって、培養シャーレから剥離した HeLa 細胞の直径が約 20 μm であることがわかった(**Figure 4.3**)。96 時間培養後の HeLa 細胞の平均数が約 10×10^5 cells/dish に増加し、本研究における HeLa 細胞の世代時間が約 27 時間であった。その結果は、Jacobson らによって報告した結果(23 時間)に近い[32]。そして、96 時間の培養後に壊死細胞また培地の懸濁が確認されていなくて、その時点で培地に存在する VOCs のすべてが生きている細胞に由来すると考えられる。以上のことから、本研究では、HeLa 細胞の培養時間を 4 日間に決めた。

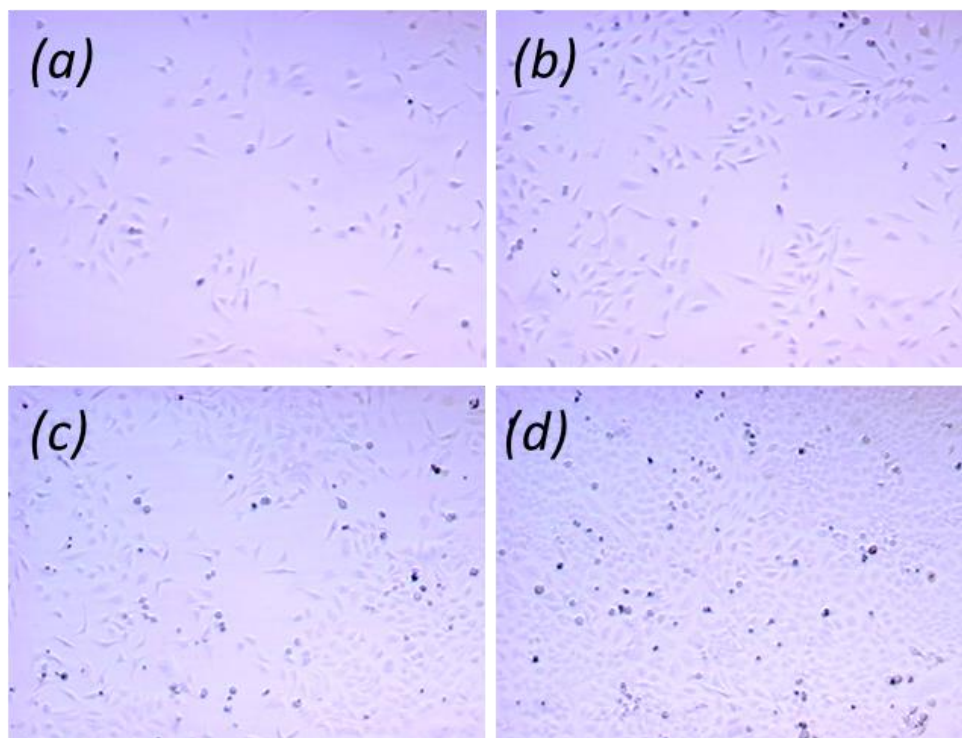


Figure 4.2. Real time images of HeLa cell in culture on dish. Brightness and contrast of the all images were corrected.

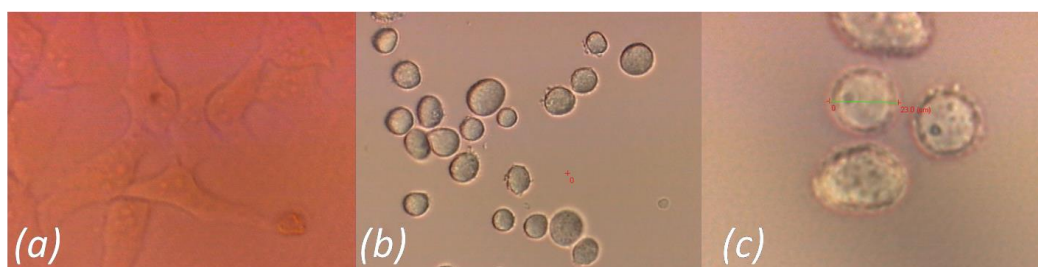


Figure 4.3. Real time images of HeLa cell in culture on the dish (a), and peeled off from the dish in the glass plate for viewing by optical microscope (b), (c). Brightness and contrast of the all images were corrected.

細胞培養の *in vitro* の研究は単独世代の細胞を培養して培地中の VOC 成分変化を調べる事例が殆どである。なぜならば、長期間継代培養は以前の継代レベルで同定された細胞株の元の機能的特性を変化させ、細胞の突然変異を引き起こ

し、腫瘍の性質を反映していないためである[4,33]。Kwak らは、メラノーマ細胞の VOC バイオマーカー研究で連続に三世代の細胞培養を行った[34]。そこで本研究は、一ヶ月近くの時間をかけ、合計 9 世代の HeLa 細胞培養を行い、世代間の HeLa 細胞の代謝に関わる VOC 分子情報を確認した。世代内と世代間の関係性を明確にし、代謝成分の再現性を強調することを目指した。

Table 4.1 に HeLa 細胞を培養した後の DMEM 培地を ZSM-5/PDMS 複合膜の抽出を経て GC-MS 分析した結果である。HeLa 細胞の代謝に関わる VOC 成分を調査するために、HeLa 細胞を培養した後の DMEM 培地、HeLa 細胞フリーの培養した培地および冷蔵庫に保存した培養培地を ZSM-5/PDMS 複合膜によって抽出し、GC-MS 分析を行い、比較に用いた。**Figure 4.4** に、96 時間培養した後の HeLa 細胞と DMEM 培地および冷蔵庫で保存した DMEM 培地のトータルイオンクロマトグラム(*TIC*)である。上記の DMEM 培地は、同じ時期に作製したものである。HeLa 細胞の世代間の変化は連続して HeLa 細胞を培養した培地(9 世代、培養したサンプルの数は HeLa 細胞が三つ、HeLa 細胞フリーが一つである)を分析することによって調査した。VOCs の同定は市販の標準試薬との比較をせずに、(NIST) mass spectral library search on (JEOL version1.5) software によって類似度が 70 %以上のピークのみを行った。

HeLa 細胞培養培地サンプルは合計 27 個であり、1 回当たりの細胞培養培地から検出された VOC 成分数が約 40 であるが、世代間再現性が示した VOC 成分を **Table 4.1** に示した 32 成分となる。細胞培養培地、細胞フリー培が共通して検出された VOC 成分のピーク面積を比較して HeLa 細胞培養後に減少した成分が 5(2-Pentanone、cyclohexanone、1-hexanol、benzaldehyde、acetophenone)であり、増加した成分が 21、新たに検出できた成分が 5(3-hexanol、acetic acid-hydroxy-ethyl ester、2,3-butanediol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol)であり、変わっていない

成分が 2 つ(1-Butanol-3-Methylthio)-propanal)であった。各 VOCs のピーク面積の比較結果を **Figure 4.5** に示した。更に、p 検定を行い、p-value が 0.05 以下である有意な増加または減少傾向が見られた VOC 成分が acetic acid-hydroxy-ethyl ester、2-butanone-3-hydroxy、2-propanone-1-hydroxy、propanoic acid-2-hydroxy、ethanedioic acid、2,5-hexanediol-2,5-dimethyl、benzaldehyde、2,3-butanediol、acetophenone、benzenemethanol-a-methyl、benzyl alcohol、dimethyl sulfone、phenylethyl alcohol および phenol の 14 成分であった。

31 成分の中で、同時に培養した DMEM と比べ、顕著に増加、減少または新たに生成した VOC 成分が殆どであり、それらが細胞培養に起因すると考えられる。P-value 検定を行うことで、有意に増加または減少した成分が 14 個であり、HeLa 細胞のバイオマーカーである可能性が高い。

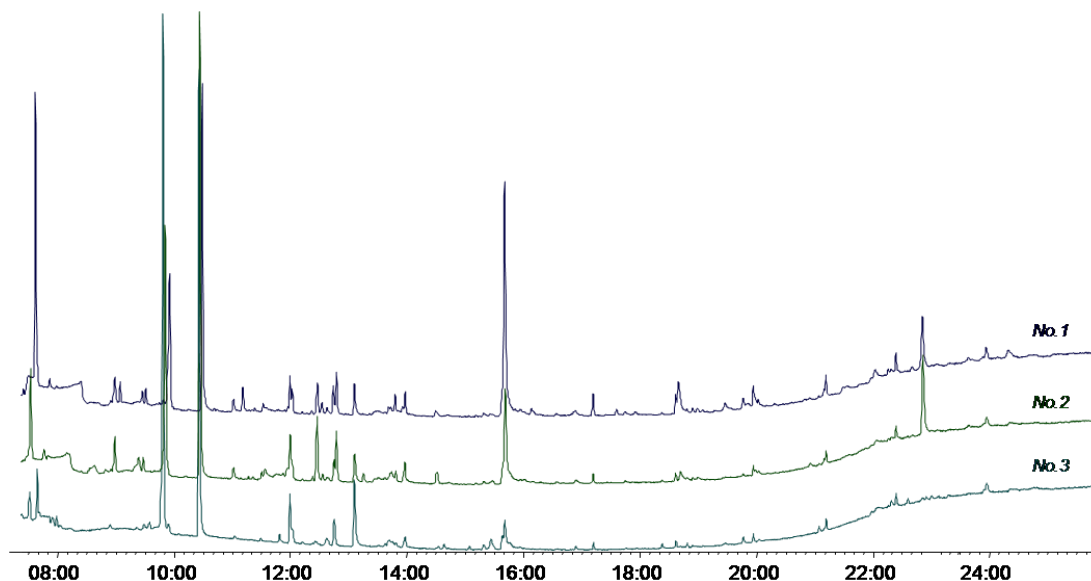


Figure 4.4. Comparison of VOCs chromatograms from the medium with cell cultured (No. 1), free medium (No. 2) and Methanol blank (No. 3).

Table 4.1. The variation of VOCs by the HeLa cell culture.

No.	Compounds	Retention time, min	Selected ion, m/z	Variation of VOCs	p-value
1	Ethanol	6:23	31	=	0.54
2	2-Pentanone	6:44	43	↓	0.16
3	3-Hexanol	7:06	59	+	-
4	2-Propanol, 1-methoxy	9:02	45	↑	0.35
5	1-Butanol	9:06	56	=	0.77
6	Acetic acid, hydroxy, ethyl ester	10:43	61	+	-
7	2-Butanone, 3-hydroxy	11:11	45	↑	< 0.0001
8	Cyclohexanone	11:20	55	↓	0.0082
9	2-Propanone, 1-hydroxy	11:23	43	↑	0.023
10	Propanoic acid, 2-hydroxy	11:31	45	↑	0.036
11	1-Hexanol	11:57	56	↓	0.84
12	Acetic acid, hydroxy	12:27	31	↑	0.20
13	Nonanal	12:31	57	↑	0.074
14	Ethanedioic acid	12:37	45	↑	0.10
15	Cyclohexanol	12:47	57	↑	0.11
16	2,5-Hexanediol, 2,5-dimethyl	12:57	43	↑	< 0.0001
17	Propanal, 3-(methylthio)	13:30	48	=	0.99
18	1-Hexanol, 2-ethyl	13:47	57	↑	0.18
19	Benzaldehyde	14:29	77	↓	0.027
20	1-Octanol	14:41	56	↑	0.046
21	2,3-Butanediol	14:58	45	+	-
22	Benzeneacetaldehyde	16:00	91	↑	0.65
23	Acetophenone	16:08	77	↓	0.031
24	Diethylene glycol monomethyl ether methacrylate	17:35	69	↑	0.12
25	Benzenemethanol, a-methyl	17:55	79	↑	< 0.0001
26	Benzyl alcohol	18:39	79	+	-
27	Dimethyl sulfone	18:59	79	↑	0.087
28	Phenylethyl alcohol	19:04	91	+	-
29	1-Undecanol	19:27	69	↑	0.29
30	Phenol	19:58	94	↑	0.0010
31	Hexadecanoic acid	22:02	60	↑	0.75
32	Docosanoic acid	24:19	60	↑	0.20

+ : New released, ↑ : released, ↓ : consumed, = : unchanged compounds.

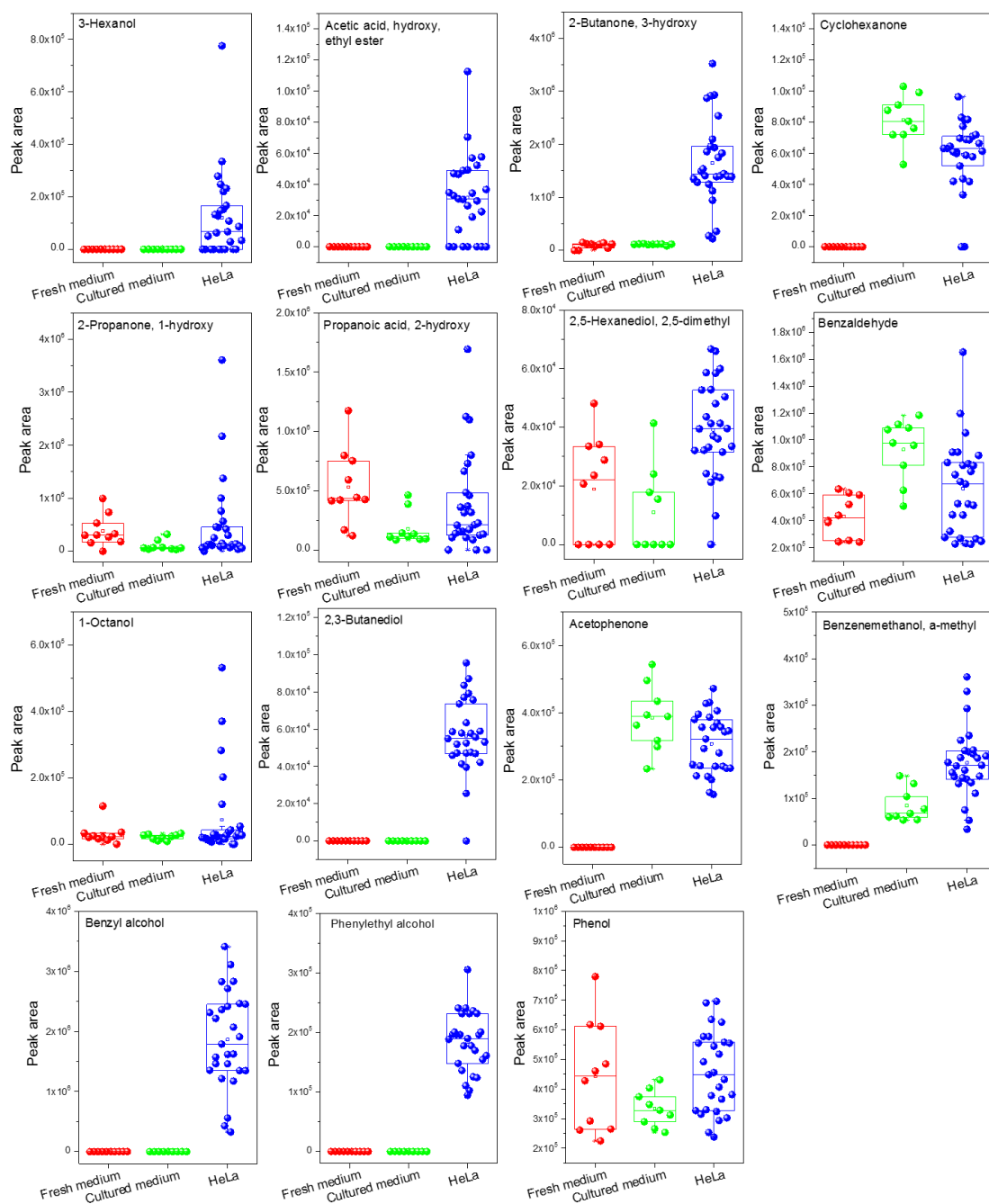


Figure 4.5. Peak area of VOCs that the p-value were less than 0.05 in HeLa cell culture.

4.3.2 世代間での揮発性低分子代謝物の再現性

細胞培養のような *In vitro* の研究では単独世代の細胞を培養して培地中の VOC 成分変化を調べる事例が殆どである。なぜならば、長期間継代培養は、以前の継代レベルで同定された細胞株の元の機能的特性を変化させ、細胞の突然変異を引き起こし、腫瘍の性質を反映していないためである[4,33]。

本研究は、一ヶ月近くの時間をかけ、9 世代の HeLa 細胞の培養を行い、世代間の HeLa 細胞の代謝に関わる VOC 分子情報を確認した。こうすることで、世代内と世代間の関係性を明確にし、代謝成分の再現性を強調することが目指す。

上記のように、9 世代の連続培養から得られた結果に基づいて、p-value が 0.05 以下で減少または増加傾向の顕著な 14 成分が HeLa 細胞の代謝に関係性を持つ可能性が高いがわかる。更に、前世代に渡り、一定の再現性が示された成分が増加成分 (**Figure 4.6**) の 2-butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol およびどうか減少傾向(**Figure 4.7**)にある 5-hepten-2-one-6-methyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde、1-heptanol である。

従来の *in vitro* 研究では、同世代の細胞に関係する代謝成分に着目し、世代間の関係を重視していない。しかし、HeLa 細胞のようながん細胞の場合はその増殖が非常に速く、比較的にかけて細胞の増殖、世代の変化に伴う代謝成分のモニタリングを行う必要があると考えられるが、そのような研究事例が少ない。2-Butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol が増加傾向にあり (**Figure 4.6**)、5-hepten-2-one-6-methyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde、1-heptanol が減少傾向にある (**Figure 4.7**)。それらの成分が最も HeLa 細胞の増殖に関わる VOC 分子である可能性が高い。2-Butanone-3-hydroxy は、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma (HCC)) および肺癌のバイオマーカーとして報告された。また、肺癌患者の呼気には、2-butanone-3-hydroxy 濃度が有意に高いと報告され

た[35]。2,3-Butanediol は、潜在的に喉頭癌の化合物をマーカーである[36]。

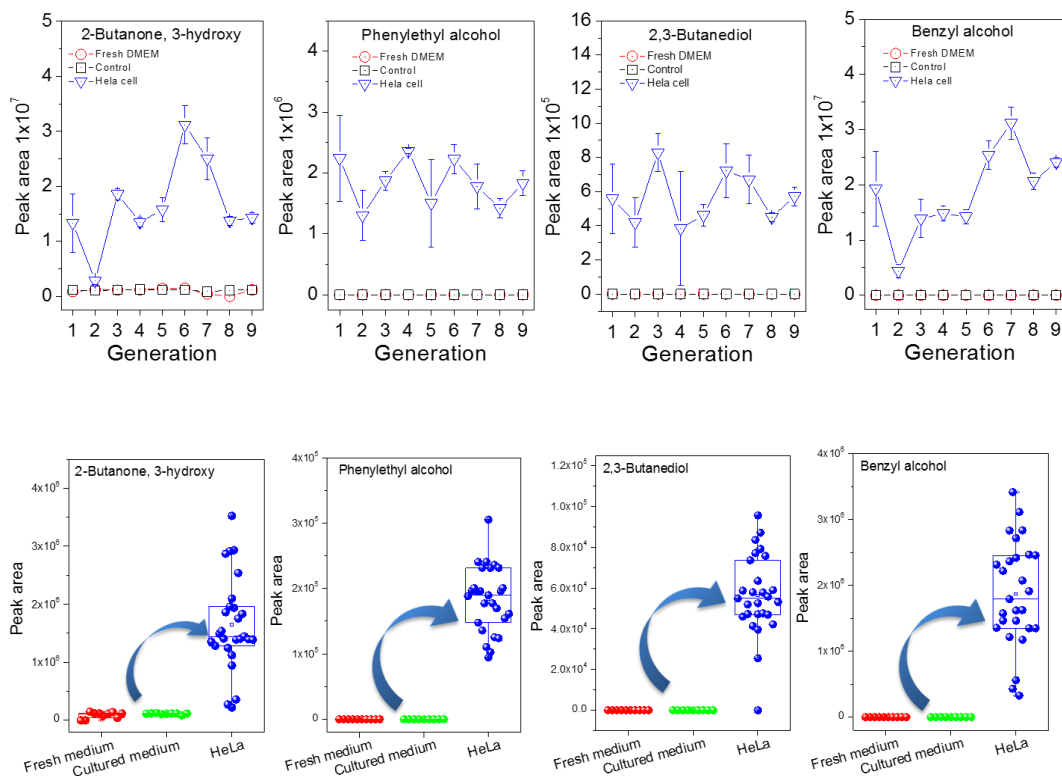


Figure 4.6. VOCs tended to increase which showed good intra-generational and inter-generational reproducibility.

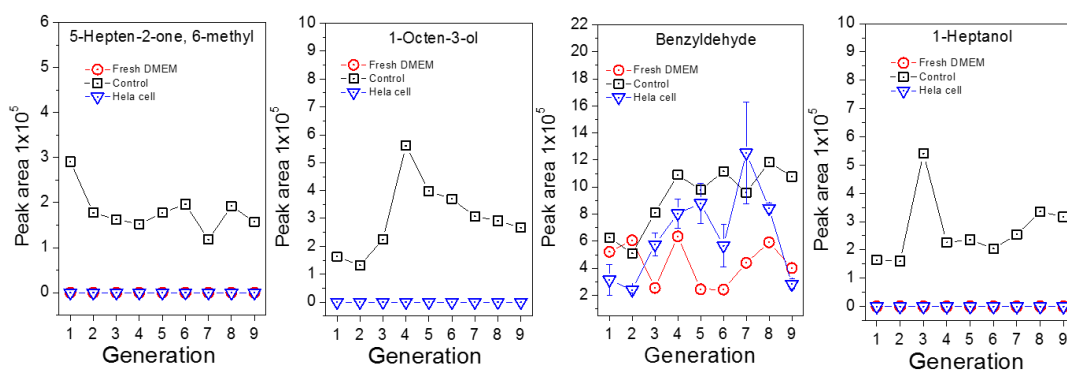
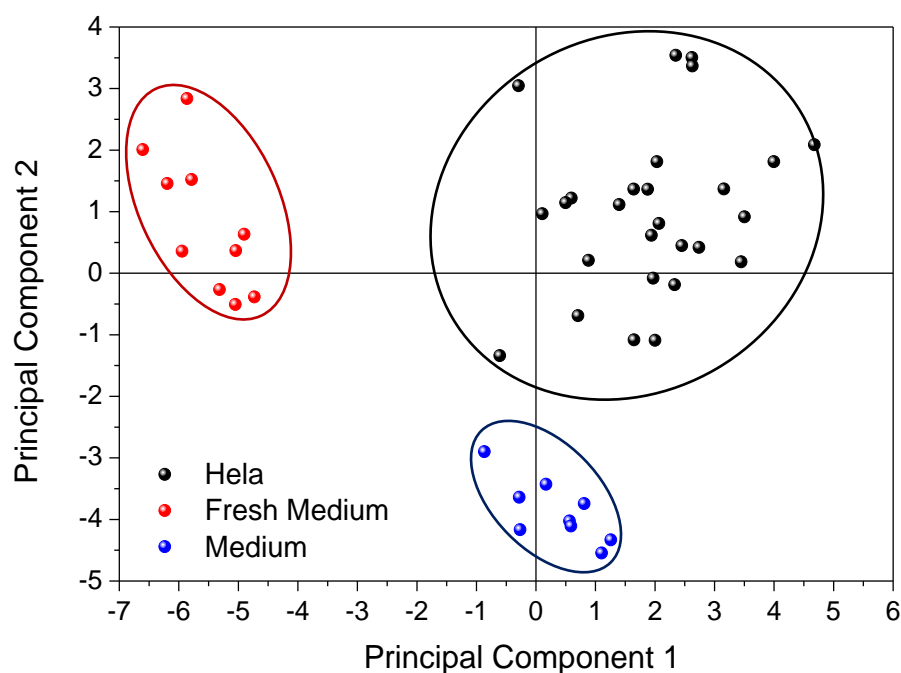


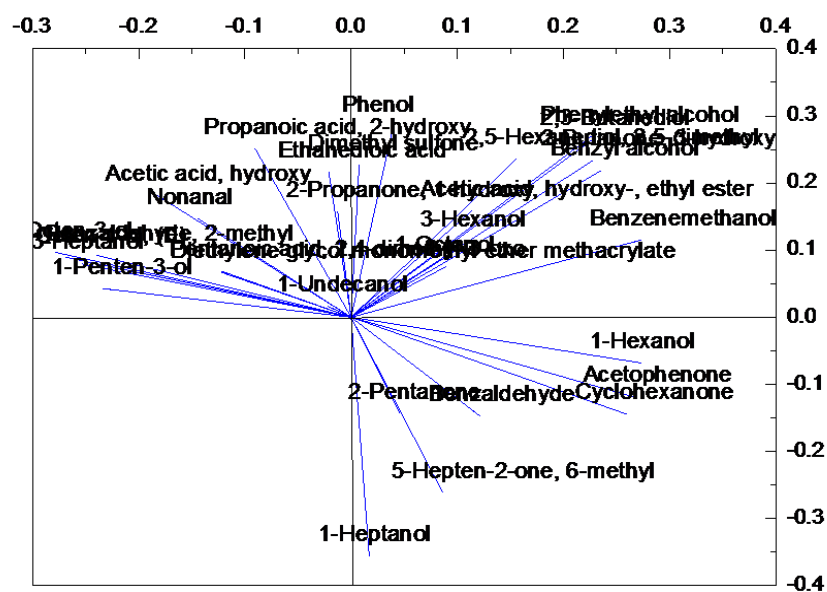
Figure 4.7. VOCs tended to decrease which showed good intra-generational and inter-generational reproducibility.

4.3.3 HeLa 細胞培養における VOC 代謝パターン

主成分分析 Principal Component Analysis (PCA)を利用して、HeLa 細胞培養後、細胞フリー、新鮮な培地の三つのグループから検出された VOC 成分をグループ分けして、データの全体の見通しを分かりやすくした。HeLa 細胞培養培地は第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)スコアの正值領域にあり、細胞フリー培地は PC1 の-1 ~ 1 の間、PC2 の-3 ~ -5 の間に位置し、新鮮培地は PC1 の-7 ~ -4、PC2 の-1 ~ -3 にある。ここで、三種類のサンプルはそれぞれグループとして集まっていることがわかり、持っている VOC 成分に共通性がある。更に、それぞれのローディングプロットを解析した。スコアプロット(**Figure 4.8a**)とローディングプロット(**Figure 4.8b**)を合わせて、HeLa 細胞培地からはローディングプロットの両方共に正に高い VOC 成分を多く検出されていることがわかる。例えば、2-butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol などがある。一方で、5-hepten-2-one-6-methyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde、1-heptanol などの減少傾向にある VOC 成分は、ローディングプロット 2 の-0.4 ~ 0、ローディングプロット 1 の 0 ~ 0.4 に位置し、単独 VOC 分子のピーク面積を比較した結果を一致していることがわかる。こうすることで、HeLa 細胞の代謝に関する VOC 成分の信頼性を PCA 分析によっても明らかにできた。



(a)



(b)

Figure 4.8. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA (a) Score plot, (b) loading plot.

検出された VOC 成分を官能基に基づいて ketone、alcohol、aromatic alcohol、ether、ester、acid、aldehyde、sulfur-containing、aromatic aldehyde および phenol に分類した(**Figure 4.9**)。インキュベーターに DMEM 培養を培養することで、ketone 類が 1.5、alcohol 類が 0.6、ether 類が 5、aromatic aldehyde 類が 2 倍増加し、acid 類が 4、aldehyd 類が 4.6、sulfur-containing 類が 9、phenol 類が 7.5 倍減少した。Hela 細胞培養後の培地は ketone、alcohol、aromatic alcohol、ether、acid、aldehyde、sulfur-containing、phenol 類がそれぞれ、2.5、1.2、5.3、2.65、4.4、1.3、1.3、1.4 倍増加し、aromatic aldehyde が 7.8 倍減少し、ester が新たに生成したことがわかる。階層的クラスター分析による HeLa 細胞培養に関わる代謝 VOC 成分の解析を行った。結果から、HeLa 細胞培養培地サンプルは近似し、集まっている。細胞フリーおよび新鮮な培地はそれぞれ集まっているが、他のグループに属するサンプルと混合していることがわかる。階層的クラスター分析はサンプルから検出された VOC 成分に基づいて細胞が存在するか否かを判断することができた。

VOC 成分のピーク面積は直接に HeLa 細胞の代謝と関係性を反映できるが、全 4 サンプル、合計 1000 以上の VOC 化合物のピーク面積を主成分分析および階層的クラスター解析を駆使することで、膨大なデータに基づき、サンプルのグループ分けを行った(**Figure 4.10**)。主成分分析と階層的クラスター解析の両方は HeLa 細胞培養、細胞フリー培地、新鮮な培地を三つのグループに分類することができた。以上から、実験を行う人の主観的な観点と解析ソフトによる客観的な視点の両方から HeLa 細胞代謝に関係する VOC 成分が存在することがいえる。このように、サンプラーのグループ分けを通じて、がん細胞が存在しているかどうかを判断できると考えられる。得られた VOC 情報をデータベース化し、出場所が分からないサンプル中の VOC 成分結果をデータベースに追加することで、

どこのグループに位置し、どのような状態であるかを評価できる。

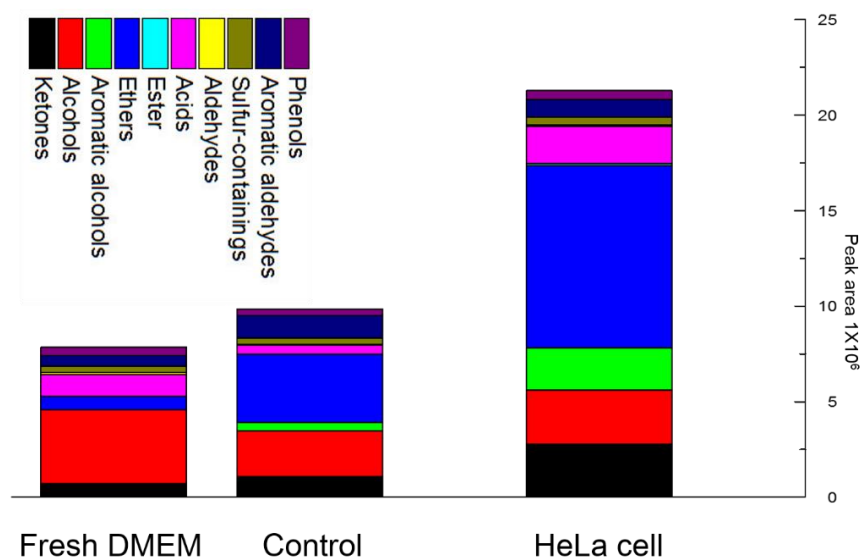


Figure 4.9. Classification of VOCs involved in HeLa cell culture.

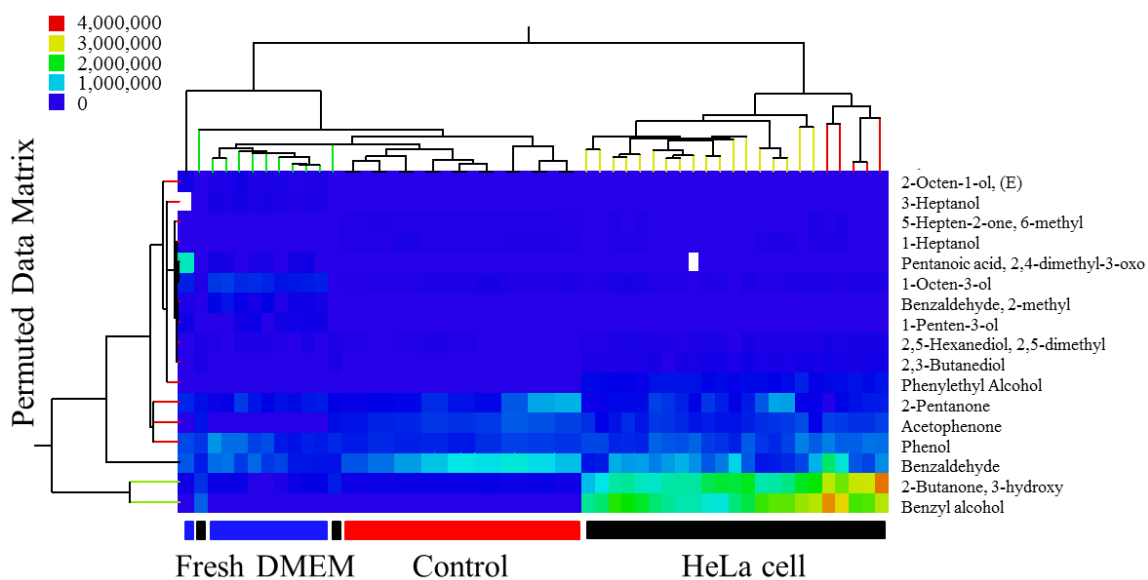


Figure 4.10. Analysis of VOCs involved in HeLa cell culture by hierarchical cluster analysis.

4.3.4 細胞培養液中 VOC 分析におけるゼオライト効果

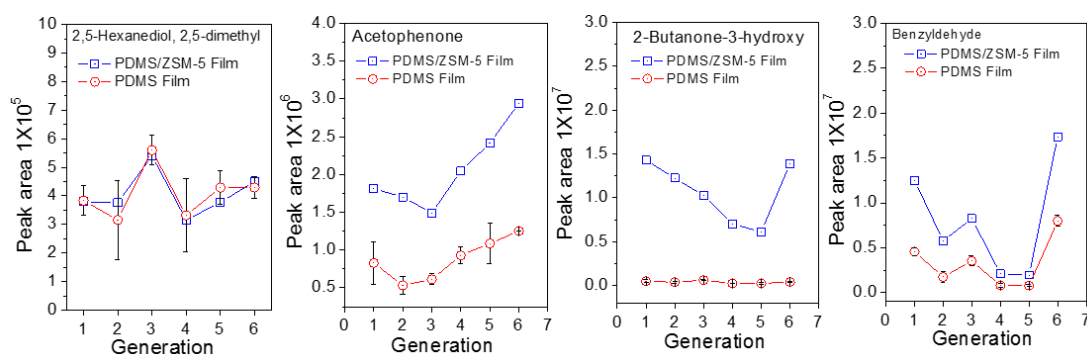
PDMS のみの膜は HeLa 細胞培養後の培地および細胞フリー培地を抽出し、GC-MS 分析を行い、PDMS/ZSM-5 複合膜と比較した。**Table 4.2** にその結果を示す。連続 6 世代の HeLa 細胞培養後の培地からは世代内および世代間に良い再現性が示したのが 9 成分である。

PDMS のみの膜は同一条件で培養した HeLa 細胞培地から 9 成分しか検出されていなくて、PDMS/ZSM-5 複合膜の 31 成分より少なく、検出された VOC 成分のピーク面積が小さいことがわかる。少量の培地に存在する微量な VOCs は、PDMS に ZSM-5 抽出材料を複合することによって分析できるようになった。従来の固相マイクロ抽出法が抽出材の小さい抽出容積、低揮発性 VOC 分子に対する不適用性の問題点があるが、PDMS/ZSM-5 複合膜の抽出は多様な VOC 分子の抽出を可能にした。更に、SPME ファイバーの低再現性を克服するために、数ヶ月前からに作製し、使用した PDMS/ZSM-5 複合膜と新しい PDMS/ZSM-5 複合膜を用いて、標準試薬である 2-methyl-1-propanol(水溶液)の抽出実験から同等のピーク面積を持つことから、PDMS/ZSM-5 複合膜が劣化していなく、水溶液中の VOC 分子を有効に抽出できる。

2,5-Hexanediol-2,5-dimethyl は PDMS 膜と PDMS/ZSM-5 複合膜が同じ程度のピーク面積を示した。Acetophenone、2-butanone-3-hydroxy、benzaldehyde は PDMS 膜と比べ、PDMS/ZSM-5 複合膜の方がピーク面積が大きいことがわかる(**Figure 4.11**)。PDMS のみ膜は抽出できる VOC 成分の種類とピーク面積が劣っている。

Table 4.2. VOCs analysis by the HeLa cell culture using PDMS film extraction.

No	Compounds	Retention time, mini	Selected ion, m/z
1	2-Pentanone	6:44	43
2	Undecane	7:55	57
3	2-Butanone, 3-hydroxy	11:11	45
4	Acetic acid, hydroxy	12:27	59
5	2-Butanol, 3-methoxy	12:35	59
6	2,5-Hexanediol, 2,5-dimethyl	12:57	43
7	1-Hexanol, 2-ethyl	13:47	57
8	Benzaldehyde	14:29	77
9	Acetophenone	16:08	77

**Figure 4.11.** Comparison of the PDMS single film and the ZSM-5/PDMS hybrid film.

従来の *in vitro* 研究では、同世代の細胞に関する代謝成分に着目し、世代間の関係を重視していない。しかし、HeLa 細胞のようながん細胞の場合はその増殖が非常に速く、比較的に時間をかけて細胞の増殖、世代の変化に伴う代謝成分のモニタリングを行う必要があると考えられるが、そのような研究事例が少ない。2-Butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol、phenylethyl alcohol が増加傾向にあり、5-hepten-2-one-6-methyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde、1-heptanol が減少傾向にある。それらの成分が最も HeLa 細胞の増殖に関わる VOC 分子であ

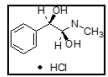
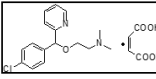

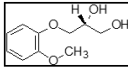
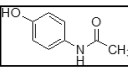

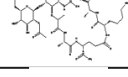


る可能性が高い。

4.3.5 薬品の添加による細胞活動への影響

パブロンゴールド A 微粒は、かぜの諸症状(せき、たん、のどの痛み、くしゃみ、鼻みず、鼻づまり、悪寒、発熱、頭痛、関節の痛み、筋肉の痛み)の緩和薬品として知られている。本研究は、HeLa 細胞培養にパブロンゴールドを投与し、がん細胞活動に与える影響を調べた。パブロンゴールド A 微粒の主成分は、一包中(0.97 g)にアセトアミノフェンが 300 mg、dl-メチルエフェドリン塩酸塩が 20 mg、グアイフェネシンが約 42 mg、無水カフェインが 25 mg、ジヒドロコデインリン酸塩が 8 mg などが含まれている。成分の詳細は、以下のホームページ(<http://www.catalog-taisho.com/04525.php>)から情報を確認できる。主成分の情報(含有量、分子構造、分子量、CAS 番号)を Table. 3.1.3 にまとめた。また、パブロン粉末を水に溶かし、ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜の抽出を経て、GC-MS 測定した結果を Table. 3.1.3 に示した。dl-メチルエフェドリン塩酸塩、マレン酸カルビノキサキン、無水カフェインおよびアセトアミノフェンは、GC-MS によって同定可能であった。

HeLa 細胞が 1×10^5 cell/dish (6 mL) にパブロンの濃度が 1 ppm になるように、細胞播種時に投与し、96 時間培養した。HeLa 細胞の世代間における再現性実験は、HeLa 細胞の連続に 4 世代の培養を通じて確認された。Figure 4.12 に HeLa 細胞培養実験の実態顕微鏡による撮影写真を示す。HeLa 細胞播種時に、パブロンに由来すると思われる大きな個体が観察された (Figure 4.12a)。96 時間後に、再び HeLa 細胞を確認したところ、HeLa 細胞の増殖が確認された (Figure 4.12b)。

Table 4.3. Details of ingredients of pabron gold and results of ZSM-5/PDMS-TFME-GC-MS analysis.

<i>compounds</i>	<i>mass (mg)</i>	<i>molecular formula</i>	<i>CAS No.</i>	<i>Mw g mol⁻¹</i>	<i>retention time, min</i>	<i>selected ion, m/z</i>	<i>structural</i>
dl-メチルエフェドリン塩酸塩, Methylephedrine hydrochloride	20	C ₁₁ H ₁₈ ClNO	18760800	215.72	21:00	72	
マレイン酸カルビノキサミン, carbinoxamine maleate	3	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₂ O ₅	3505382	404.85	27:00	58	
無水カフェイン, Caffeine	25	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	2436420	194.19	23:47	194	
グアイフェネシン, Guaifenesin	42	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	93141	198.22	18:28	124	
アセトアミノフェン, Acetaminophen	300	C ₈ H ₉ NO ₂	103902	151.16	×	×	
ジヒドロコデインリン酸塩, 5alpha,6alpha)-3-methoxy-17-methyl-4,5-epoxymorphinan-6-ol phosphate (salt)	8	C ₁₈ H ₂₆ NO ₇ P	24204135	399.38	×	×	
リゾチーム塩酸塩, lysozyme from human neutrophils	20	C ₃₆ H ₆₁ N ₇ O ₁₉	12650883	895.91	×	×	
ビスイブチアミン, Sulbutiamine	8	C ₃₂ H ₄₆ N ₈ O ₆ S ₂	3286462	702.89	×	×	
リボフラビン (ビタミンB2) , Riboflavin	4	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	83885	376.36	×	×	

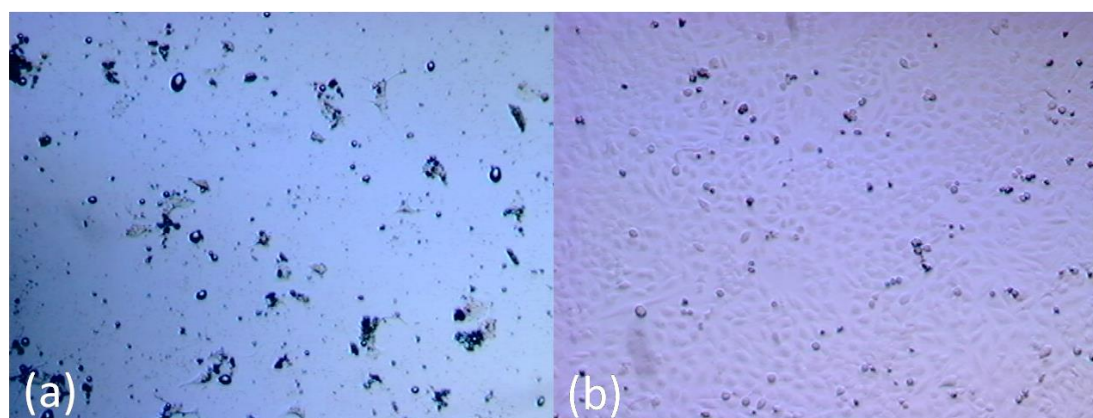


Figure 4.12. Real time images of HeLa cell in culture with 1 ppm of pabron on dish (a) straight after HeLa cell seeding and (b) after 96 hours cultured.

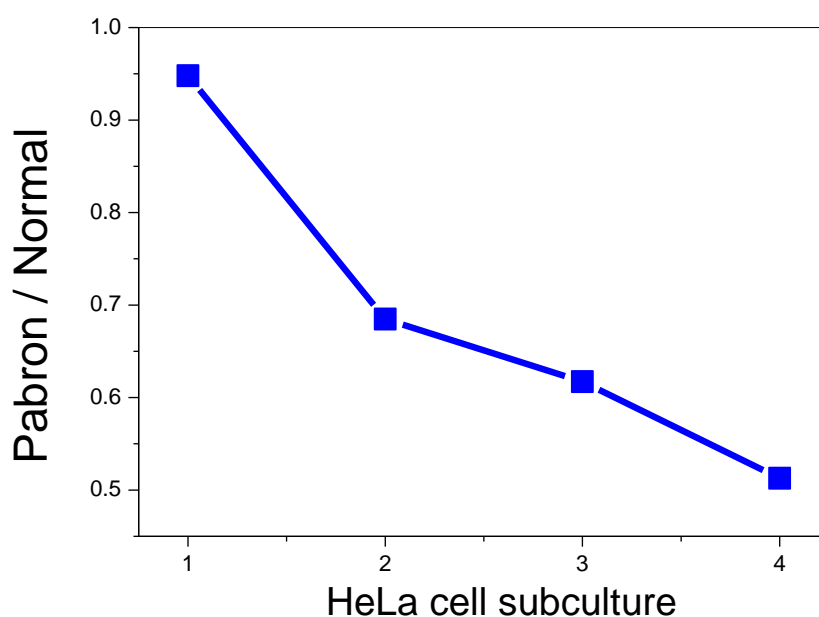


Figure 4.13. Confirmation of number of HeLa cell culture under normal culture condition and pabron administration culture condition and inter-generational reproducibility.

パブロン投与による HeLa 細胞の VOC 代謝を確認する前に、HeLa 細胞数の変化を確認した。**Figure 4.13** に通常の条件で 96 時間培養した HeLa 細胞数をパブロン投与後に得られた HeLa 細胞数で割った値を示した。1 世代目から 4 世代目に渡って、細胞数の比率が 1.055、1.46、1.62、1.95 であり、パブロン投与の条件下で HeLa 細胞の継続的な培養は、HeLa 細胞数が継代する度に減少していたことがわかる。従って、HeLa 細胞培養にパブロンを投与することで HeLa が細胞増殖とアポトーシスを引き起こしたと考えられる。

Table 4.4 にパブロン投与後の HeLa 細胞の VOC 代謝の分析結果を示した。パブロン投与後に、1-penten-3-ol、1-butanol-3-methyl、methylephedrin が新たに検出された。Methylephedrin は、パブロンゴールドの主成分である dl-メチルエフェドリン塩酸塩に由来すると考えられる。しかし、その他の主成分であるマレン酸カルビノキサキン、無水カフェインおよびアセトアミノフェンは、検出されな

った。その原因は、それらの成分の濃度が低くて ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜の抽出を経て、GC-MS の検出可能な量に達していないことや HeLa 細胞に消費され、他の成分に変換されたことが考えられる。一方で、パブロン投与によって、通常の培養条件で HeLa 細胞の代謝成分である 2-hexanol、2-propanol-1-methoxy、1-butanol、acetic acid-hydroxy-ethyl ester、cyclohexanone、2-propanoic-1-hydroxy、nonanal、2,5-hexanediol-2,5-dimethyl、1-octen-3-ol、propanal-3-(methylthio)、1-octanol、2,3-butanediol、benzenemethanol-a-methyl、1-undecanol および docosanoic acid は、検出されなくなった。通常条件とパブロン投与条件で得られた各 VOC 成分の t 検定を行い、成分の有意差を確認し、その結果を **Table 4.4** に示した。有意差を示した VOCs (p -value が 0.05 以下) は、ethanedioic acid、cyclohexanol、benzaldehyde、oxime-methoxy-phenyl、phenylethy-alcohol となった。

注意すべきことは、前述のように、HeLa 細胞は、2-butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol および phenylethyl alcohol を排出し、5-hepten-2-one-ethyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde および 1-heptanol を消費する。しかし、パブロン投与によって、2,3-butanediol が完全に検出されなくなり、benzyl alcohol が減少した。また、減少傾向を示した benzaldehyde と 1-heptanol は、逆に増加したことがわかる。パブロン投与は、通常の条件で培養した HeLa 細胞の VOC 代謝と異なる VOC 代謝メカニズムを示した。それは、HeLa 細胞数の減少に由来すると考えられるが、HeLa 細胞がパブロン成分を内部にとり込んで細胞の VOC 代謝に大きく変更したことが考えられる。各 VOC 成分のピーク面積の比較結果は、**Figure 4.14** に示した。赤いプロットは、パブロン投与後の HeLa 細胞の VOC ピーク面積であり、緑のプロットは、薬品投与をしていない HeLa 細胞培養の結果である。更に、**Figure 4.15** に得られたパブロン投与で培養した HeLa 細胞、投与していない HeLa 細胞培養、冷蔵庫で保管していた DMEM および 96 時間培

養した DMEM 培地の 4 つの試料から得られた結果の PCA 分析結果を示した。

異なる試料団の区別ができ、客観的にパブロン投与による HeLa 細胞の細胞増殖抑制、アポトーシスまたは VOC 代謝に関与したことを証明した。

Table 4.4. The variation of VOCs metabolism of HeLa cells by administration of pabron.

No.	Compounds	Retention time,	Selected ion,	Variation of	<i>p</i> -value
		min	m/z	VOCs	
1	2-Pentanone	6:52	43	↑	0.0026
2	3-Hexanol	7:06	59	-	
3	2-Propanol, 1-methoxy	9:02	45	-	
4	1-Butanol	9:06	56	-	0.078
5	1-Penten-3-ol	9:07	57	+	
7	1-Butanol, 3-methyl	9:58	55	+	
8	Acetic acid, hydroxy-, ethyl ester	10:43	61	-	0.22
9	2-Butanone, 3-hydroxy	11:23	45	-	
10	Cyclohexanone	11:20	55	-	
11	2-Propanone, 1-hydroxy	11:23	43	-	0.082
12	Propanoic acid, 2-hydroxy	11:31	45	-	
13	1-Hexanol	11:57	56	-	
14	Acetic acid, hydroxy	12:27	59	-	0.041
15	Nonanal	12:31	57	-	
16	Ethanedioic acid	12:37	59	↓	
17	Cyclohexanol	12:47	57	↓	0.0055
18	2,5-Hexanediol, 2,5-dimethyl	12:57	43	-	
19	1-Octen-3-ol	13:14	57	-	
21	1-Heptanol	13:20	70	↑	0.59
20	Propanal, 3-(methylthio)	13:30	48	-	
22	1-Hexanol, 2-ethyl	13:47	57	-	
23	1-Octanol	14:41	56	-	0.0001
24	Benzaldehyde	14:29	77	↑	
25	2,3-Butanediol	14:58	45	-	
26	Benzeneacetaldehyde	16:00	91	-	0.10
27	Acetophenone	16:08	77	-	
28	Oxime-, methoxy-phenyl	16:52	133	↑	
29	Diethylene glycol monomethyl ether methacrylate	17:35	69	-	0.28
30	Benzenemethanol, α -methyl	17:55	79	-	
31	Benzyl alcohol	18:39	79	-	
32	Dimethyl sulfone	18:59	79	-	0.093
33	Phenylethyl alcohol	19:04	91	-	
34	1-Undecanol	19:27	69	-	
35	Phenol	19:58	94	-	0.86
36	Hexadecanoic acid	22:02	74	-	
37	Methylephedrin	20:59	72	+	
38	Docosanoic acid	24:19	74	-	0.71

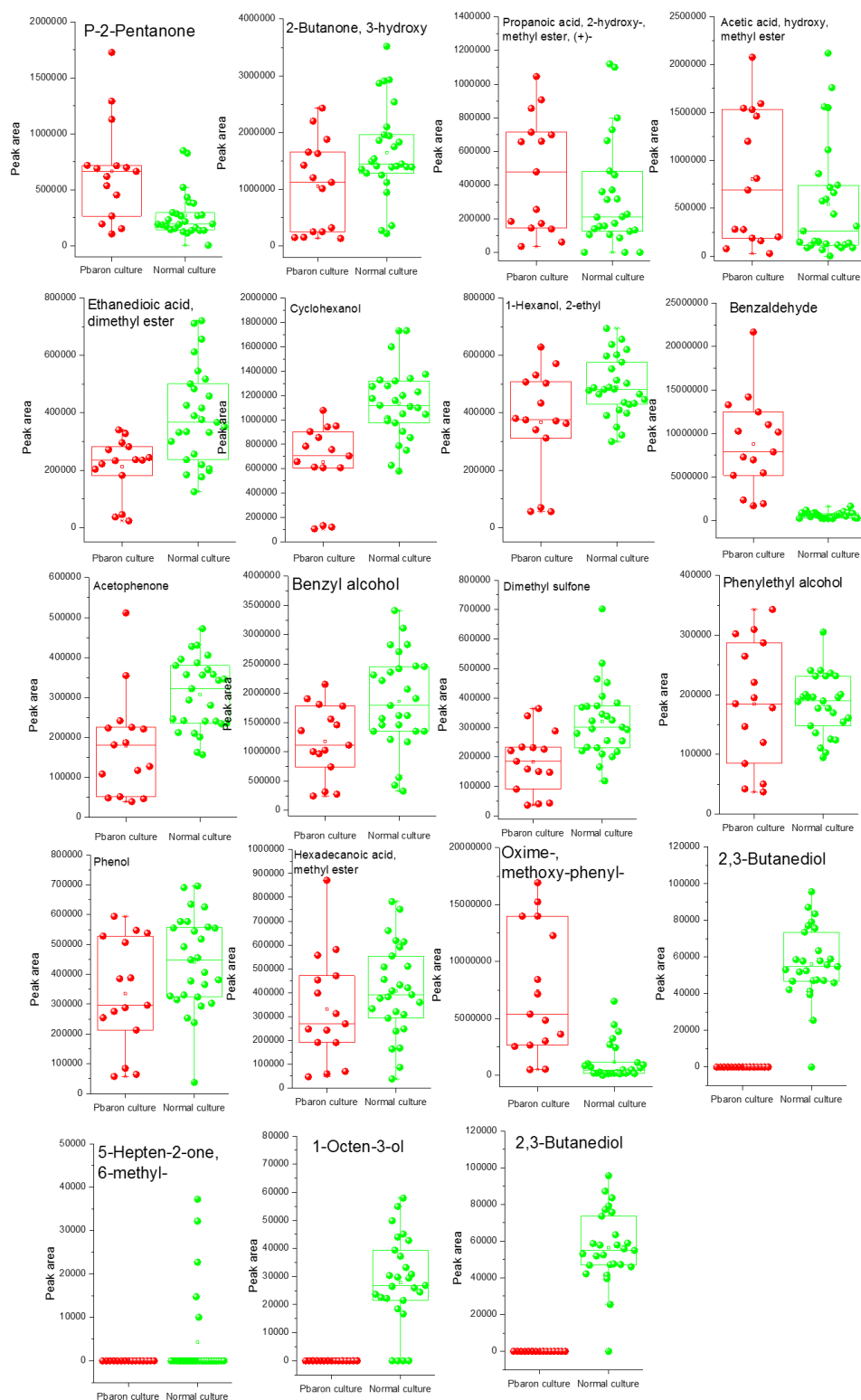
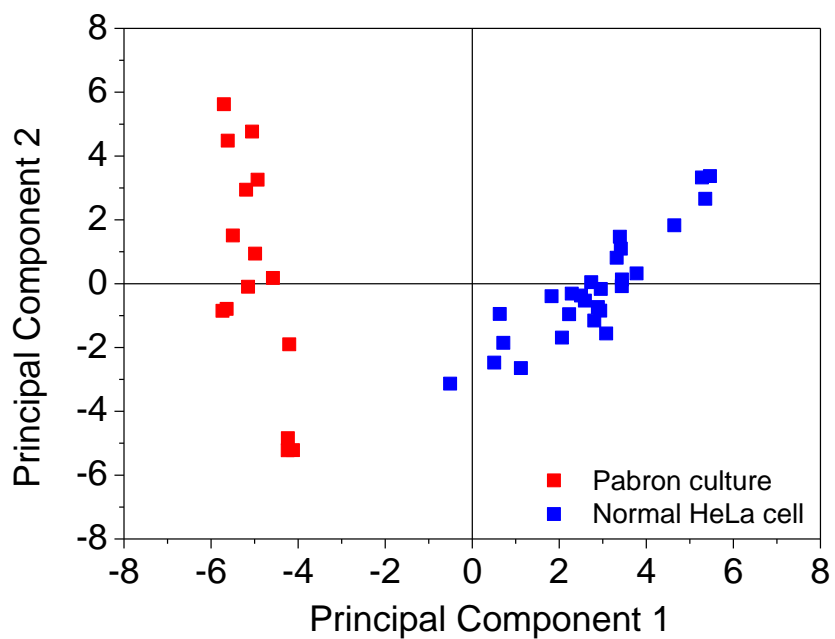
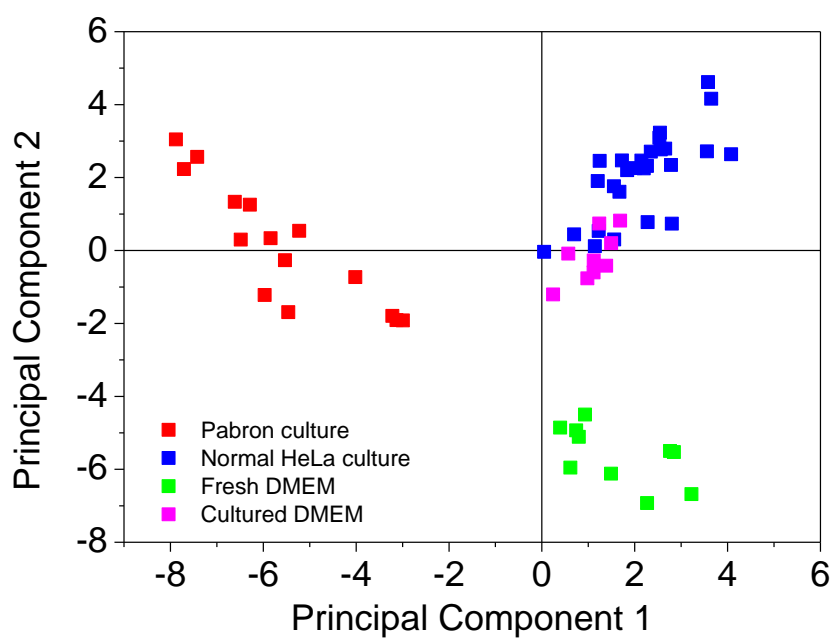


Figure 4.14. Comparison of peak area of VOCs detected from HeLa cell culture under normal and pabron administration conditions.



(a)



(b)

Figure 4.15. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA (a) cultivation results under different conditions and (b) comparison of two cell cultures samples and two DMEM medium control.

4.4 結論

本章では、ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜の抽出を介した HeLa 細胞培養に関わる VOC 情報を GC-MS の同定によって解明した。ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜は、大きな抽出容積、高い安定性、高感度などの利点を持つため、高感度に HeLa 細胞培養培地に存在する微量な VOCs の抽出を可能にした。9 世代分の HeLa 細胞培養培地、細胞フリー培地および新鮮な DMEM 培地の VOC 代謝を比較することで、有意に増加または減少傾向を示した VOC 成分が存在した。2-Butanone-3-hydroxy、2,3-butanediol、benzyl alcohol および phenylethyl alcohol は、増加傾向を示し、5-hepten-2-one-6-methyl、1-octen-3-ol、benzaldehyde および 1-heptanol は、減少傾向を示した。以上の 8 成分は、良好な世代内、世代間の再現性を示した。主成分分析および階層的クラスター解析を駆使することで、それらの VOC 成分が HeLa 細胞のバイオマーカーであることを裏付けた。本研究の ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜と GC-MS 分析の併用手法は、高感度な VOC 分析を実現しただけではなく *in vitro* 研究の細胞培養に関係する VOC 分子情報を明確化した。また、HeLa 細胞培養に市販風邪薬であるパブロンゴールドを 1 ppm 程度投与し、培養実験を行った。パブロン投与は、HeLa 細胞数が通常条件で同時培養した HeLa 細胞数の平均的に 0.66 倍に減少した。パブロン投与は、HeLa 細胞増殖とアポトーシスを誘導したと考えられる。更に、パブロン投与後には、2,3-butanediol が完全に検出されなくなり、benzyl alcohol の検出量が減少した。減少傾向を示した benzaldehyde と 1-heptanol は、それぞれ増加した。パブロンは、HeLa 細胞の増殖を抑制し、その結果、HeLa 細胞の VOC 代謝を大きく変更したことがわかる。

第 5 章

生体 VOC と疾患相関の解明: ヒト肝 癌細胞株(HepG2)における揮発性 低分子バイオマーカーの探索

第 1 節

HepG2 における揮発性低分子バイオマーカーの探索

5.1.1 緒言

肝臓は、代謝、解毒および排泄の 3 つの働きがあり、人体において極めて重要な臓器である。人間の胃袋で消化された食べ物が小腸に吸収され、タンパク質がアミノ酸に、糖質がブドウ糖に、脂質が脂肪酸に変換される。次に、それらの物質は、血液に乗り、肝臓に運ばれ、肝臓で栄養物質に変化されて人体に提供される。解毒は、有害な薬剤やアルコールを無害な物質に変えることである。肝臓による排泄は、肝臓で人体にとって不要な物質を胆汁に変換し、それを分泌し、排泄物として排出する。一方で、肝臓がんは、初期症状が不明確で転移が早いため、患者が肝臓がん気づく時に既に後期になっている例が多い。肝臓がんを治療しない場合は、患者が半年以内に亡くなり、5 年間での生存率が 5% 以下である。その原因は、肝臓がんの早期発見が他のがん細胞と比較して困難であることとなる。肝臓がんは、5 cm 程のがん組織に成長したとしても判断可能な初期症状が乏しい。また、5 cm 以上の肝臓がん組織を治療することも困難である。最初の肝臓がん細胞の出現から 5 cm ほどのがん組織に成長するのに約 10 か月がかかる。更に、肝臓がんの増殖が進んで、肝臓の葉の一個分に拡散するまでに約 9 か月かかるといわれている。無症候性のサブ臨床開発から若干の肝癌の早期臨床徴候が発見されるまで、約 3~6 か月かかる。そのため、肝臓がんの早期発見が極めて困難でありながら、極めて重要なことである。

肝臓がんの原因は、主に B 型肝炎ウイルス感染、アフラトキシン汚染、食品に含むニトロソアミン、長期的なアルコール乱用、発癌物質への長期暴露、いく

つかの前癌病変、遺伝的要因などがある。初期症状は、尿の色が濃い、むくみ（体がむくむ）、腹水（お腹に体液がたまる）、疲れやすい・体がだるい（倦怠感）、食欲がない（食欲不振）、黄疸、白目や肌が黄色くなる、発熱、便通異常（便秘・下痢）および貧血などが挙げられる。肝臓がんの治療方法は、手術治療（肝臓の切除）、移植手術、エタノール注入法、マイクロ波凝固療法、ラジオ波、塞栓療法などがある。

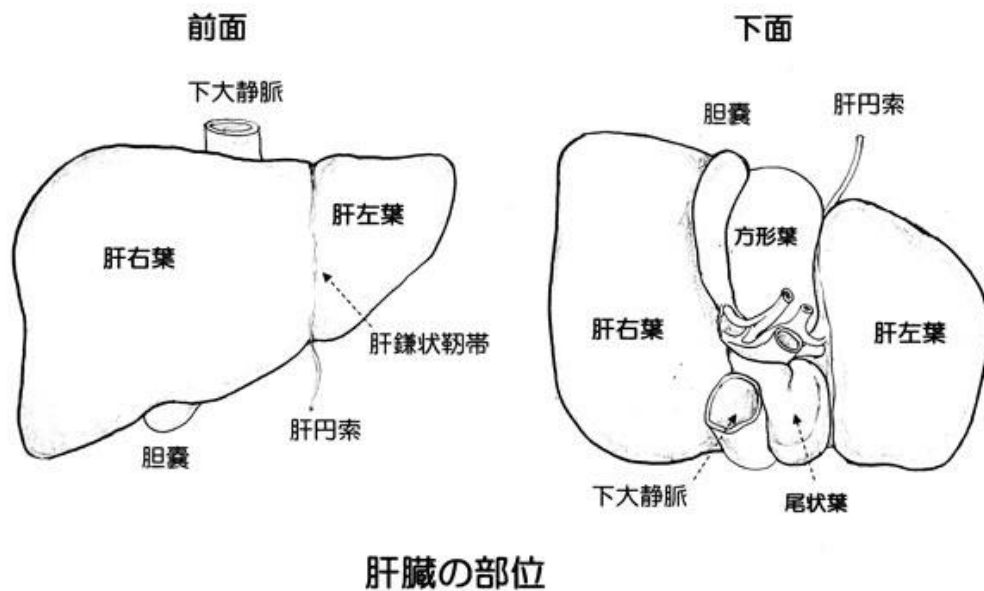


Figure 5.1.1. Schematic diagram of human liver.

肝細胞癌は、世界中で 5 番目の一般的な癌であり、遺伝的突然変異およびウイルス感染などの様々な臨床病理学的特徴と関連している。したがって、肝細胞癌の診断および治療のための新しい推定マーカーの同定研究を行う研究例が数多く存在する。肝臓由来の分化細胞株のヒト HepG2 細胞は、ウイルス感染がないため、肝細胞癌モデルとして使用される純粋な細胞株である[1]。また、HepG2 細胞は、よく分化した形質転換細胞株であり、信頼性の高いモデルかつ培養が容

易などの利点を持つために、生化学的および栄養学的研究に広く使用される[2,3,4]。HepG2細胞は、最初は15歳の白人男性の肝生検から単離された[5]。そして、HepG2細胞は、がん細胞バイオマーカーの研究のためのモデルとして使用されている[6-10]。

本章では、HepG2細胞培養を通じて、新たな分析技術を用いてVOCs分子情報を解明する。従来の研究では、がん患者から呼気の濃縮、SPMEファイバーによる体液（尿液や唾液）のHSガスを用いた分析方法が広く用いられた[11]。また、肺がん細胞の培養を行い、HS法で細胞から排出された2,3,5-トリメチルヘキサン、2,4-ジメチルヘプタンが肺がんの高い相関を示すことが明らかであった[12]。HS—SPMEファイバー法は、サンプリング時間の短縮、コストの削減、有機溶媒フリー、良い再現性などの利点からもっと広く用いられてきたが、揮発しにくい成分に不適合であること、不純物による不可逆的な吸着、GC注入口における熱脱離による吸着剤の劣化などが問題点として挙げられている。

このような問題を克服するために、本研究では、肝臓モデルに代替できるHepG2がん細胞を利用し、細胞培養の培地から代謝されたVOCsをゼオライトのZSM-5とPDMSの複合薄膜を用いて抽出し、GC-MS分析を行った。新たな優れたバイオマーカーの発見に繋がると期待する。

5.1.2 実験項目

5.1.2.1 使用試薬

ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ モル比 = 30, Lot: 110421)は、JGC Catalysts and Chemicals Ltd から購入した。PDMS 溶液キット(Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit)を Dow Corning Ltd から購入した。ベース溶液(Sylgard 184A)と硬化剤溶液(184B)は 10:1

の比率で混合し、PDMS ポリマーを製造した。Methano は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd から入手した実験に用いた化合物は全て分析等級であり、更に精製することなく使用した。脱イオン純水(18.3 M Ω ·cm)はイオン交換および濾過(ミリポア、direct QTM)に続いて逆浸透によって得た。

5.1.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜の作製

容量が 50 mL のガラスサンプル瓶を ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜の支持体として使用した。PDMS モノマーに対して重量比が 10 および 20 wt%になるように ZSM-5 を加えて均一に混ぜ、1.0 g の混合試料をサンプル瓶の底に垂らし、室温で 3 日間静置し、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を硬化させた。更に、ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜を 100 °C の乾燥機の中で 1 時間熱処理を行った後、メタノールを振とうさせながら 3 日間複合膜の洗浄を行った。同様に ZSM-5 を添加していない PDMS 単体膜を作製して ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜との比較に用いた。

5.1.2.3 HepG2 細胞培養

ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 細胞は、理研 CELLBANK(TKG0205)から入手した。初代目の HepG2 細胞培養は、液体窒素からコニカルバイアル細胞を出し、凍結細胞の解凍から始めた。具体的な操作は以下の通りである。

1. コニカルバイアル細胞を液体窒素から出して湯浴に入れて解凍した。
2. 解凍した細胞を消毒済のクリーンベンチに移した。
3. 15 mLのプラスチック遠心管にDMEM培地を12 mL程度に入れた。
4. ピペッターでコニカルバイアル内の細胞をゆっくりピペッティングして全てプラスチック遠心管に移した。

5. 少しピペッティングし、プラスチック遠心管を遠心分離器で1000 rpm、3分間遠心分離を行った。
6. 遠心分離後、プラスチック遠心管をクリーンベンチに移し、上澄み液をできるだけ取り除いて新しい培地を加え、ピペッティングをした。
7. 細胞培養専用のディッシュに6 mL入れ、細胞の混ざった培地をディッシュに播種した。
8. 蓋をして、床に置いたままでディッシュを少し揺らしてインキュベーターに入れた。

以上の手順で冷凍したHepG2細胞を解凍してから、一定の時間培養し、細胞がディッシュを充満する前に細胞の継代を行った。以下の手順で細胞培養を行う。初代目の解凍した細胞の培地を廃棄する以外、二代目からの細胞培養の培地をプラスチック遠心管に回収し、GC-MS分析を行う。

1. 消毒済みのクリーンベンチに培養中のディッシュを入れ、培地を15 mLプラスチック遠心管に移してGC-MS分析の準備をしておいた。
2. 温めたPBS 1 mLをディッシュに入れ、ディッシュを洗浄して取り除き、二回繰り返した。
3. マイクロピペッターを用いて温めたトリプシンをピペッティングし、ディッシュに0.6 mL加え、インキュベーター内で約3分間放置して細胞をディッシュから剥がした。
4. 3分後、ディッシュをクリーンベンチに戻し、冷たいDMEM培地を1 mLディッシュに加え、トリプシンの活性を止め、マイクロピペッターを用いてディッシュにトリプシンを掛け流し、細胞をディッシュから剥離させた。
5. マイクロピペッターで、ピペッティングしたり、ディッシュに液を掛け流したりして細胞を分散させながらディッシュの中の液を全て15 mL遠心管内に入れた。

6. 遠心管内の液の全量が13 mLになるように培地を加えた。
7. 遠心分離機を用いて1000 rpm、3分間で遠心分離した。
8. 遠心後、ピペット管で上澄み液をできる限り取り除いた。
9. ピペット管で培地を適量加えてマイクロピペッターでよくピペティングし、エッペンドルチューブに少量移し、クリーンベンチ内から取り出してセルカウントプレートでセルカウントを行った。
10. セルカウントの結果より、 5×10^5 個毎ディッシュとなるように計算し、新しいディッシュに播種し、ディッシュ内の液総量が6 mLとなるように調製したDMEM培地を加えた。
11. ディッシュを揺らし、細胞が均一になるよう広げてインキュベーター内に入れた。

以上のように細胞培養と

継代を5世代連続に行った。各世代の細胞培養は、3つのディッシュ分の細胞を培養し、同時に細胞なしの3つのディッシュに6 mLのDMEM培地を入れ、培養した。細胞なしのDMEM培地と細胞含有のDMEM培地は、同様な条件でインキュベーターの中72時間の培養を行った。ここで、人間の内環境を模擬してインキュベーターの条件設定は、1大気圧で二酸化炭素の濃度を5%に設定し、温度は37°Cに設定した。

5.1.2.4 細胞の計数

細胞継代の手順⑨に一定量のDMEM培地を入れ、HepG2細胞を希釈してから少量の液をエッペンドルチューブに移し、細胞の計数を行った。ここで、細胞数の計算には、ビルケルチュルク (Burker-Turk) 血球計算盤を用いた。この計数盤の本体中央のステージには細胞注入部が2箇所あり、それぞれに細胞計数部がある。細胞計数部の左上、右上、左下、右下の四つのコーナーの正方形を細胞計数室として使う。各細胞計数室の正方形の辺の長さは1.0 mmであり、細胞計数部の本体とバープレートの間は、0.1 mmの隙間があるため、各細胞計数室の容積は

10-4 mLとなる[24]。具体的な手順は以下の通りである

1. 血球計数盤を水で洗ってからキムワイプで水気を除いて清潔にした。
2. 血球計数盤にカバーガラスを載せ、指ですり合わせるようにしながら、カバーガラスを割らない程度に軽く力を入れて密着させた。
3. 細胞混合液をよくピペッティングして細胞が均一になるようにし、カバーガラスと計数盤の密着した隙間部分に混合液を約10 μ L注入し、光学顕微鏡で計測した。
4. 1 mm \times 1 mm 区画内の全細胞数をコントロールし、大体1区画内の細胞数が100個以内に調節した。

以上の手順で各サンプルの細胞数は3区画数え、その平均数を取った。なお、各細胞計数室の容積は 10^{-4} mLとなるため、サンプルの総細胞数はHepG2細胞希釈用のDMEM培地の量で計算した。各世代の3サンプルの平均細胞数を取り、細胞数を見積もった。

5.1.2.5 試料のサンプリング

細胞継代の手順①で回収した細胞培養済みDMEM培地を15 mLのプラスチック遠心管に移し、クリーンベンチから取り出し、氷の中に保存した。イオン交換水を用いてZSM-5/PDMSハイブリッド膜サンプル瓶を洗浄し、窒素で十分乾燥させた後、ピペッターを用いてプラスチック遠心管からDMEM培地5 mLを乾燥したサンプル瓶に入れた。蓋をしてシェーカー（200 rpm/min）に入れ、3時間抽出を行った。3時間振とうした後、サンプル瓶の中のDMEM培地を捨て、イオン交換水で軽く洗浄し、窒素乾燥を行った。十分乾燥させたサンプル瓶に100 μ Lのメタノールを入れてVOCsの脱離操作を行った。その後、メタノール抽出液を1 μ L取り、GC-MS分析を行った。

5.1.2.6 GC-MS 測定条件

GC-MS 測定は、それぞれ、JMS-Q1000GC (JEOL, Japan) と Agilent 7890A のを 70 eV 電子イオン化 (EI) モードで行った。GC-MS は JMS-Q1000GC (JEOL, Japan) を用いた。カラムは DB-WAX (ポリエチレングリコールベースの高極性固定相、内径 0.25 mm、吸着層厚み 0.5 μ m、長さ 30 m) を用いた。GC 注入口の温度は 230°C でキャピラリーカラムの温度は 40°C で 3 分間、10°C/min で 230°C まで昇温し、10 分間保持して測定した。キャリアガスは超高純度ヘリウムガス (純度 99.999%) を 1 mL/min の速度で流した。測定は Splitless モードで行った。MS 設定については動作条件が電子衝突イオン化モードで 70 eV とした。イオン源および GC インタフェースの温度はそれぞれ 200°C および 230°C に設定した。データ解析はフルスキャンモードで (m/z = 25~310)、スキャンタイム 0.3 秒で行った。同定は National Institute of Standards and Technology (NIST) マススペクトルライブラリーサーチ (JEOL version 1.5) ソフトウェアを用いた。

5.1.3 結果および考察

5.1.3.1 HepG2 細胞培養における揮発性低分子代謝物分析の結果

各世代の HepG2 細胞培養から VOC 分析実験において、細胞ありの DMEM 培地 3 サンプルと細胞なしの DMEM 培地 (細胞ありの DMEM 培地と同じ条件下で静置) 3 サンプル合わせて 6 回の GC-MS 分析を行った。各サンプルの GC-MS 分析結果から検出された VOCs の中で、世代間再現性を示した VOCs の各成分の増加および減少する傾向を調査した。その結果を **Table 4.1.1** に示す。Ethanol、2-pentanone、3-hexanol、3-penten-2-one-4-methyl、1-butanol、3-hexanol、2-butanone-3-hydroxy、cyclohexanone、1-hexanol-2-ethyl、benzaldehyde、1,3-dioxan-5-ol-4,4,5-

trimethyl、enzyl alcohol、1-undecanol、phenol および hexadecanoic acid の 17 成分は、培養したすべての HepG2 細胞培養培地から検出された。同じ条件で培養した HepG2 細胞ふりーな DMEM 培養の分析結果と比較して、二つの集団の各 VOCs 成分のピーク面積比較を介して、t 検定を行い、その結果を **Table 4.1.1** に示した。分析に用いたサンプルは、全て同様な条件下でサンプリングを行ったため、母集団が正規分布に従うと仮定し、パラメトリック t 検定を用いることができ、各化合物の *p*-value を算出した。**Table 4.1.1** から、17 種類化合物の内、増加する傾向が見られたのは、1-butanol、2-butanone-3-hydroxy、cyclohexanol、benzaldehyde、benzyl alcohol の 5 成分である。減少する傾向が見られたのは、2-pentanone、cyclohexanone、1-hexanol-2-ethyl、1,3-dioxan-5-ol-4,4,5-trimethyl、1-undecanol、phenol の 6 成分である。パラメトリック t 検定を行った結果として、増加および減少傾向を示す *p*-value が 0.05 以下の化合物は、増加傾向の 4 種類 (1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde、benzyl alcohol) と、減少傾向の 4 種類 (cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol, 4,4,5-trimethyl、1-undecanol、phenol) である。ここで、0.05 以下の *p*-value は、データに統計学的有意差や信頼性があることを意味する。

HepG2 細胞培養後の DMEM 培地から検出した VOCs の各ピーク面積の比較を行い、5 世代分の DMEM 培地中の 17 種類化合物のピーク面積をボックスプロットで示している。*p*-value が 0.05 以下で有意差が見られた VOCs のピーク比較結果を **Figure 4-1-2** に示した。その他の VOC 成分のピーク面積の比較結果を **Figure 4-1-3** に示した。以上の結果から分かるように、それぞれの化合物において増加または減少の傾向が見られた。

Table 5.1.1. The variation of VOCs by the HepG2 cell culture.

No.	Compounds	Retention time, min	Selected ion, m/z	↑ (released) or ↓ (consumed)	p-Value
1	Ethanol	6:01	31	—	0.5
2	2-Pentanone	6:25	43	↓	0.1
3	3-Hexanol	6:50	59	—	0.3
4	3-Penten-2-one, 4-methyl	8:29	83	—	0.1
5	1-Butanol	8:51	56	↑	< 0.0001
6	3-Hexanol	9:29	59	—	0.7
7	2-Butanone, 3-hydroxy	10:55	45	↑	0.1
8	Cyclohexanone	11:05	55	↓	< 0.0001
9	Nonanal	12:19	57	—	0.2
10	Cyclohexanol	12:32	57	↑	< 0.0001
11	1-Hexanol, 2-ethyl	13:34	57	↓	0.1
12	Benzaldehyde	14:14	77	↑	< 0.0001
13	1,3-Dioxan-5-ol, 4,4,5-trimethyl	16:18	59	↓	0.02
14	Benzyl alcohol	18:20	79	↑	< 0.0001
15	1-Undecanol	19:14	55	↓	0.005
16	Phenol	19:41	94	↓	0.004
17	Hexadecanoic acid	22:00	74	—	0.3

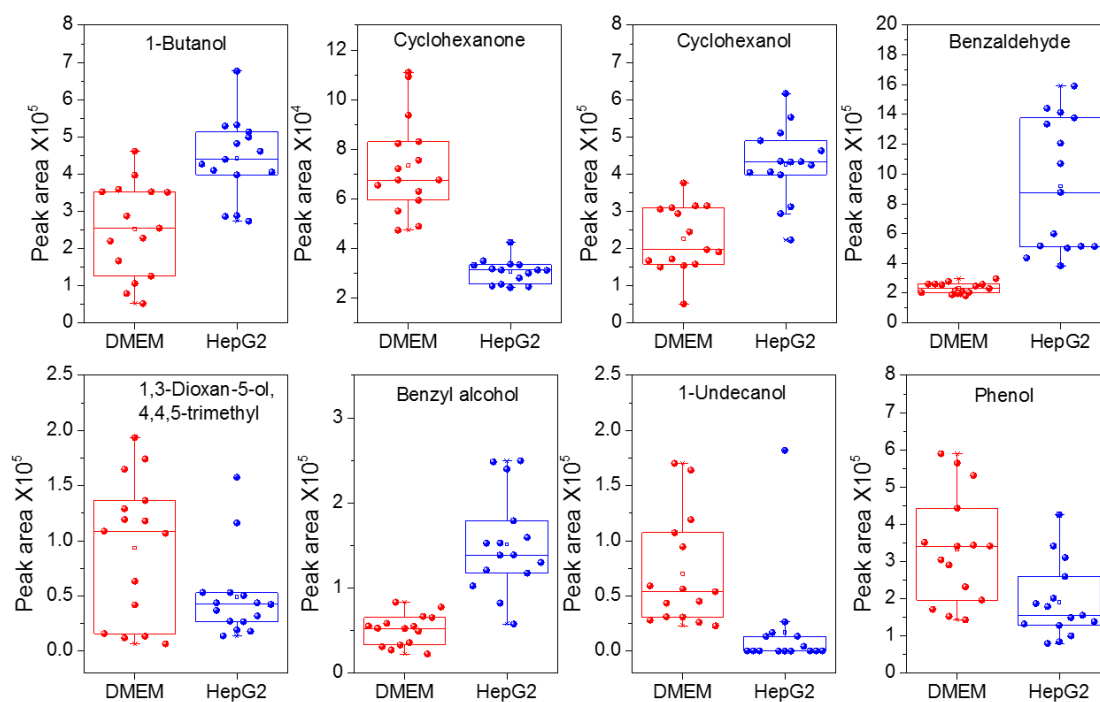


Figure 5.1.2. Peak area of VOCs that the p-value were less than 0.05 in HepG2 cell culture.

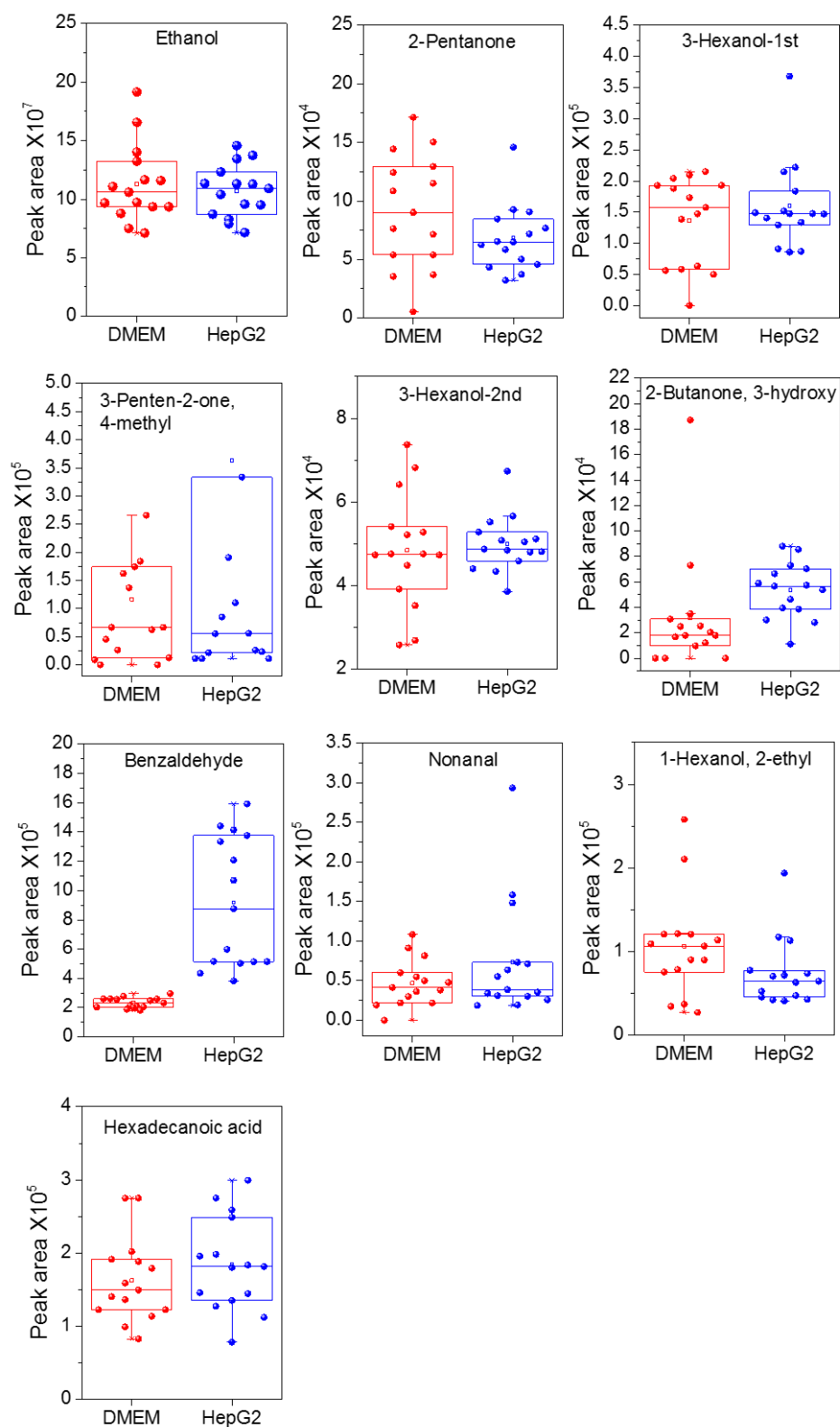


Figure 5.1.3. Peak area of VOCs detected in HepG2 cell culture.

5.1.3.2 揮発性低分子代謝物の世代間変化の確認

p -value0.05 が以下の化合物の再現性を調べるために、5 世代を継代しながら行った分析結果を **Figure 4-1-4** に示す。相対ピーク面積の有意な増加を示した 1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde および benzyl alcohol は、減少傾向を示した。Cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol、4,4,5-trimethyl、1-undecanol および phenol の世代間変化を示し、1,3-dioxan-5-ol、4,4,5-trimethyl の 5 世代目を除いて、他の成分は、5 世代に渡って良好な世代間 VOCs 代謝パターンを示した。

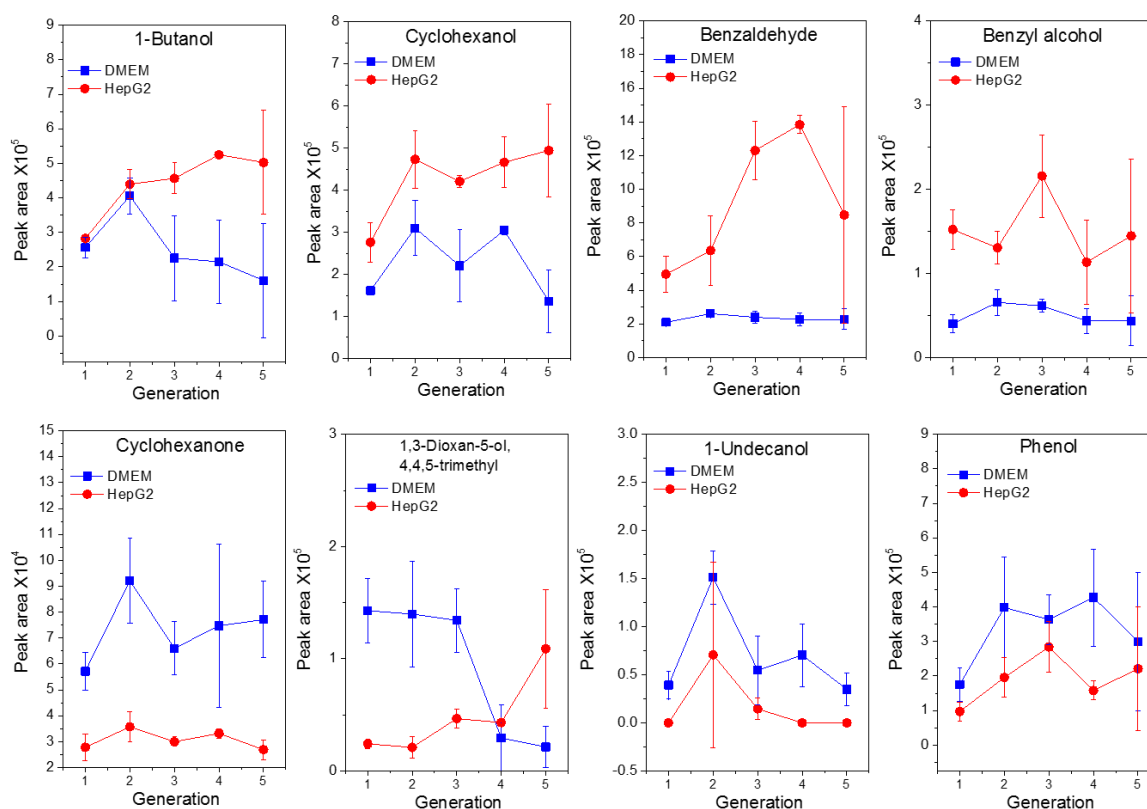


Figure 5.1.4. Peak area of 8 VOCs which showed significant increase or decrease.

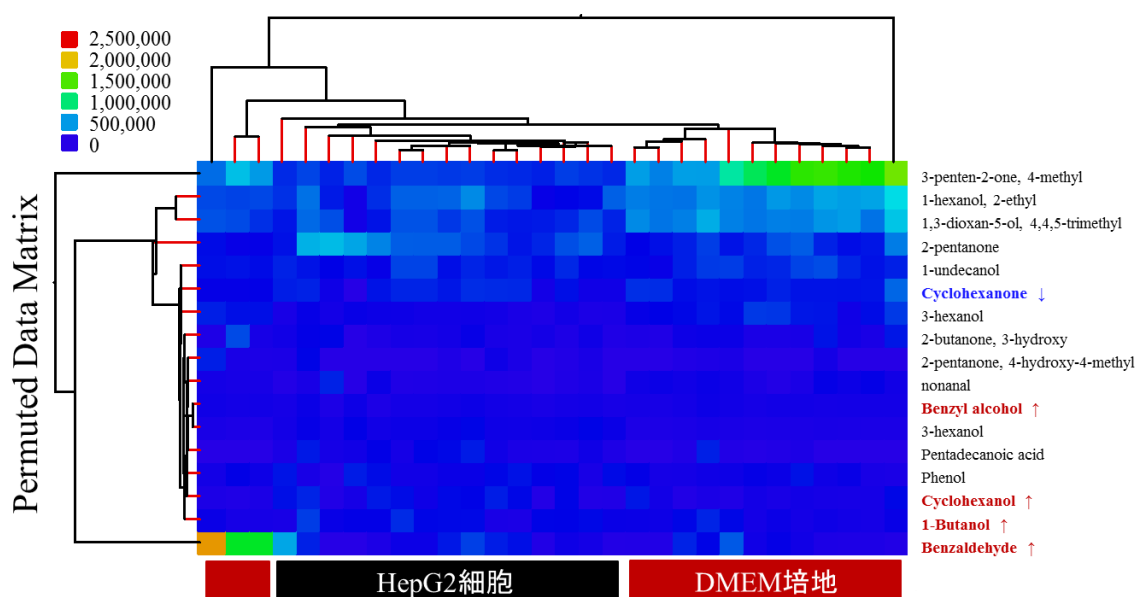


Figure 5.1.6. Analysis of VOCs involved in HeLa cell culture by hierarchical cluster analysis.

5.1.4 結論

以上の結果より、1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde、benzyl alcohol の 4 種類化合物は、5 世代の HepG2 細胞培養後、再現性よく増加傾向を示し、cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol-4,4,5-trimethyl、1-undecanol、phenol の 4 種類化合物は、再現性よく減少傾向を示した。従って、増加傾向の 4 種類の化合物は HepG2 細胞の増殖とともに生成される代謝物であり、減少傾向の 4 種類化合物は HepG2 細胞の成長過程において消費されるものと考えられる。HepG2 細胞培養後に得られた VOC 分子情報に基づいて、主成分分析を行ったところ、HepG2 細胞ありと細胞なしの培地が明らかに区別できた。従って、これらの化合物は、HepG2 ががん細胞のバイオマーカーである可能性が高いと考えられる。HepG2 細胞と Hela 細胞は、同じ細胞フリーな培養した DMEM 培地と比較したにも関わらず、異なる VOC パターンを示した。したがって、本研究手法は、がん細胞培養における VOC 代謝の分析に適用していると考えられる。

第 2 節

HepG2 細胞培養から同定された揮発性バイオマーカー の HepG2 細胞の代謝への影響

5.2.1 緒言

従来の研究では、細胞への薬品投与実験は、主に細胞のアポトーシスを誘発させる抗がん剤の研究に焦点が絞られている。例えば、抗がん剤の投与によって細胞活動が抑制され、それらの抗がん剤が細胞に与える影響を調べる研究である[1]。しかし、細胞自身が生産した代謝物や消費した栄養物、特に代謝に関係するVOCsに基づいた細胞活動への影響を調査する研究はこれまで行われていない。

本研究においてHepG2細胞培養実験でHepG2がん細胞から8種類の揮発性がんバイオマーカーが特定された。それらの化合物の中で、増加傾向の化合物は、HepG2細胞が排出した代謝物であり、減少傾向にある化合物は、HepG2細胞が消費した栄養分であると考えられる。これらの化合物は、HepG2細胞にどのような影響を与えるのかを調べることでバイオマーカーとしての効果が検証できると考えられる。HepG2細胞培養に有意差が見られたVOC分子をHepG2細胞培養に添加し、それによる細胞生存率の変化とVOC代謝パターンの変化を調査した。VOCsの投与実験は、液状のVOCsの投与とVOC蒸気の暴露の両方を行い、投与経路効果の比較実験を行った。本研究で発見した潜在的なVOCsバイオマーカーの有用性を実証した。また、従来肝臓がんの抗がん剤として知られているgambogic acid(GA)酸を投与し、HepG2細胞のVOCs代謝変化を確認した。Gambogic acid(GA)誘発細胞死の決定のための新しいバイオマーカーを発見するためにVOCsを分析した。Pyoらは、ヒト肺がん細胞培養にシスプラチン抗がん剤を添加したとこ

ろ、nonanal、1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzeneおよび2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dioneは、ヒト肺がん細胞のアポトーシスのVOCバイオマーカーとして使用することができる[2]。3つの化合物の濃度は、アポトーシスおよびアポトーシス細胞間の相関係数に比例して増大した。一方、decaneは、壊死率の増加に伴って変化するアポトーシスとは無関係であり、壊死期に帰属する可能性がある。

5.2.2 実験操作

5.2.2.1 液相 VOC バイオマーカーの投与

今回の実験では、各世代は6サンプルがあり、細胞なしのDMEM培地サンプル一つ、添加なしの細胞培養サンプル一つ、薬品添加濃度がそれぞれ50 ppb、100 ppb、500 ppb、1000 ppbの細胞培養サンプル4つである。また、今回の実験に播種した細胞数は 3×10^5 となった。実験操作は、以下のように実施した。

1. 消毒済のクリーンベンチに細胞ディッシュを入れ、ピペッターで培地を取り除いて15 プラスチック遠心管に入れた。
2. 各サンプルの細胞の洗浄、細胞剥離、細胞計数をそれぞれ行った。
3. 予備用の細胞ディッシュと無添加の細胞サンプルを播種用細胞とし、5個のディッシュに 3×10^5 個の細胞を入れた。
4. 全量が6 mLになるよう、添加濃度に応じて普通の培地と試薬含有の培地を割り込んで入れた。
5. ディッシュを揺らし、細胞が均一になるよう広げてインキュベーター内に入れた。

5.2.2.2 VOC バイオマーカーのガス暴露

液相の VOCs を直接に細胞培養ディッシュに添加した以外に、インキュベーターに VOCs の水溶液を入れ、細胞培養を行いながら、VOCs 水溶液から揮発した VOCs ガスの暴露を受けさせた。Scheme 1 に示したように、HepG2 細胞の数が 3×10^5 cell/dish になるように、6 mL の DMEM 培地に播種し、合計 6 個用意した。そして、細胞フリーの DMEM 培地を 2 個分用意した。細胞ありシディッシュ 3 つと細胞なしのディッシュ 1 つをインキュベーターA とインキュベーターB にそれぞれ、入れた。2つのインキュベーターは、同じ培養条件になるように設定した。最後に、インキュベーターB に VOCs 水溶液が入っているディッシュを入れ、細胞培養と同じ 72 時間放置した。比較実験として、HeLa 細胞と A549 細胞(1×10^5 cell/dish)を播種し、それぞれのインキュベーターに 1 個入れ、96 時間培養した。

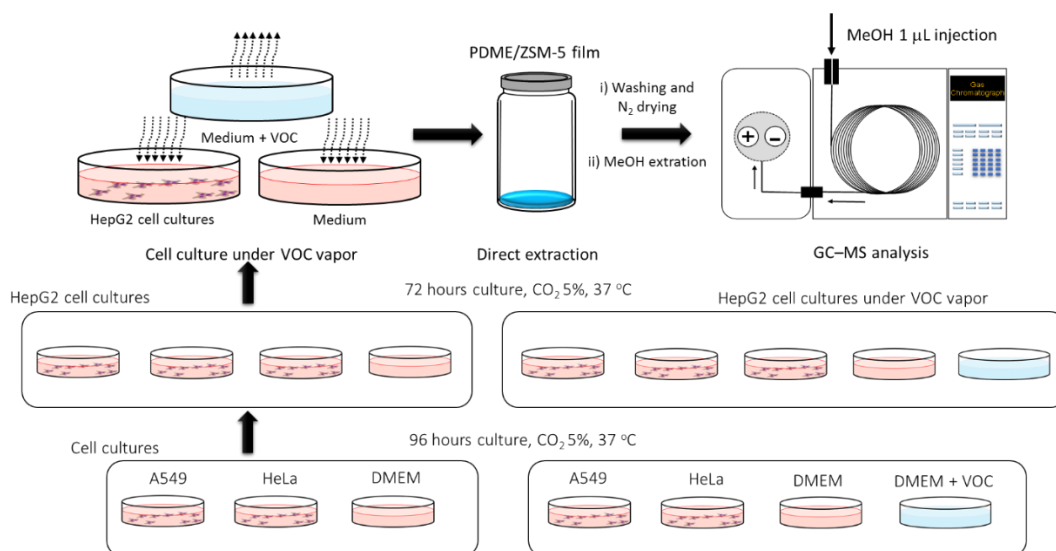


Figure 5.2.1. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via ZSM-5/PDMS composite thin film.

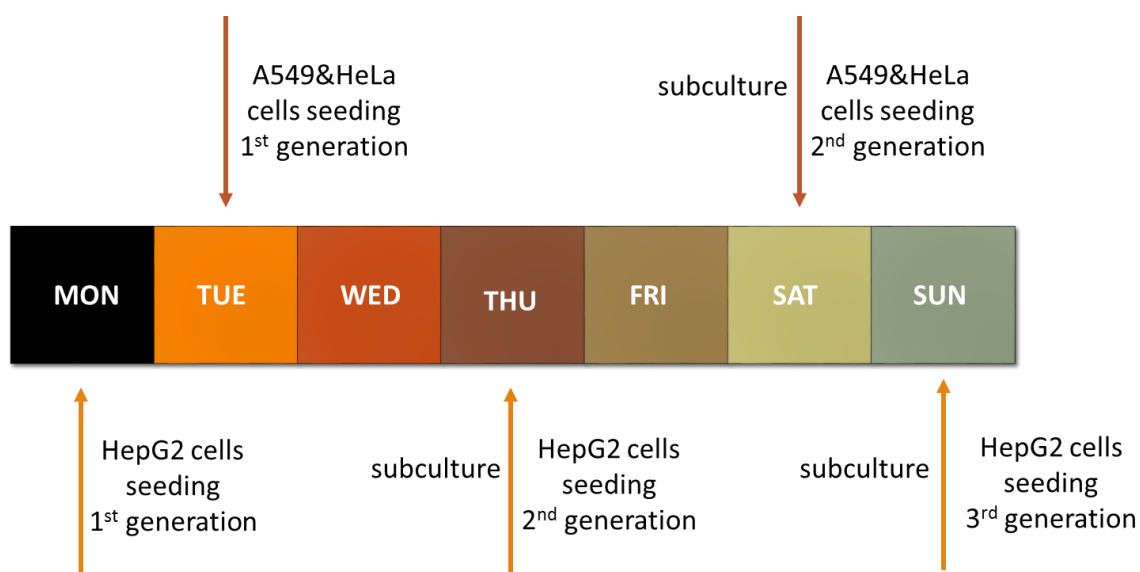


Figure 5.2.2. Schedule of HepG2 and HeLa, A549 cells culture and GC-MS analysis.

5.2.3 結果および考察

5.2.3.1 液相 VOC バイオマーカーの投与による HepG2 細胞数の変化

本実験では、増加傾向の化合物を選択し、薬品投与実験を行った。投与実験の前、1-butanol, cyclohexanol と benzyldehyde の性質を調べて薬品は投与実験への適合性を調査した。これらの薬品の性質を **Table 5.2.1** に示した。各化合物は室温条件下では、液体であり、薬品投与に適合であると考えられる。特に、水への溶解度は投与時の濃度条件や培養期間中の残存量を予測するのに重要な要素と考えられる。

Table 5.2.1. Physico-chemical characteristics of analytes used for this chapter.

試薬名	分子式	分子量	融点[°C]	沸点[°C]	水溶解度[g/L]
1-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	74.12	-89	117.6	80
Cyclohexanol	C ₆ H ₁₂ O	100.16	23	161	0.36
Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106.12	-26	179	0.001 以下

HepG2 細胞に 1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde は、それぞれ、50, 100, 500 および 1000 ppb になるように、液体の VOC 溶液を投与した。VOCs の投与実験は、すべて 5 世代分の HepG2 細胞の平均細胞数で計算した。その結果、VOCs が投与していない HepG2 細胞のコントロールサンプルと比較して、cyclohexanol、benzaldehyde の投与によって HepG2 細胞数変化が見られなかった (**Figure 4.2.3**)。一方で、50 ppb の 1-butanol を投与した場合は、HepG2 細胞数が投与していないサンプルより、HepG2 細胞数には、約 35% の減少が見られた。100 ppb の 1-butanol を投与した場合は、HepG2 細胞数が約 20% 減少した。高濃度の 1-butanol (1000 ppb) を投与した場合は、HepG2 細胞数が約 25% 増加した。低濃度の 1-butanol の投与は、HepG2 細胞の成長に大きい影響を与えたと考えられる。そこで、1-butanol は、6 mL の DMEM 細胞培養培地の中で 5, 25, 50, 100, 500, 1000 になるように、細かい濃度投与実験を行った。その結果を **Figure 5.2.3** に示した。25 ppb の 1-butanol の投与によって、HepG2 細胞数が約 25% 減少した。5, 100, 500 ppb の投与は、HepG2 細胞数に変化が見られなかった。以上の結果から、25 ppb の 1-butanol は、HepG2 細胞の成長を妨げ、HepG2 細胞のバイオマーカーである可能性が高い。

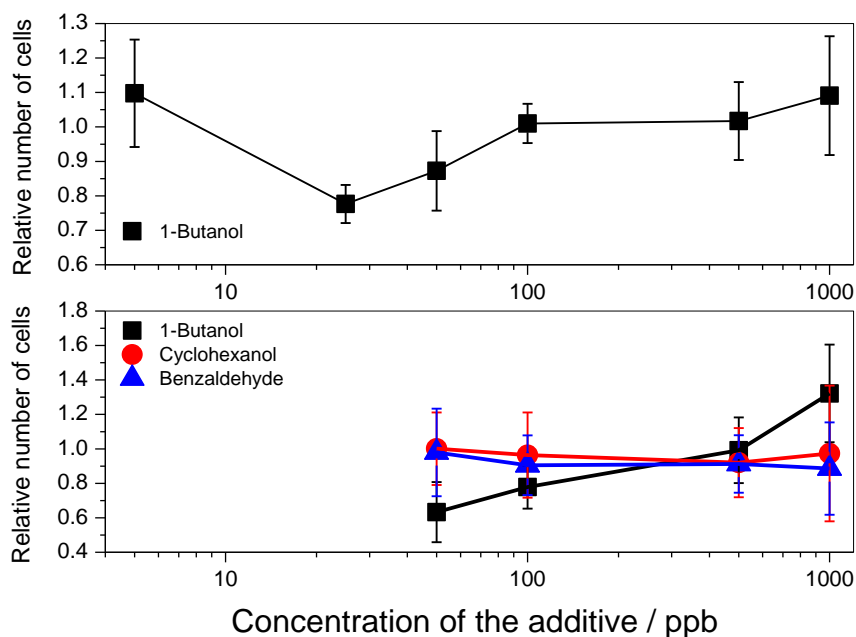


Figure 5.2.3. Effect of HepG2 cell activity by administration of VOCs (1-butanol, cyclohexanol and benzyldehde) in liquid phase.

5.2.3.2 液相 VOC バイオマーカーの投与による HepG2 細胞 VOCs 代謝への影響

1-Butanol のピーク面積の変化は、予想通りに 1-butanol の添加濃度によって増加し続け、1000 ppb の投与後に約 3 倍増加したことがわかる。低濃度の 1-butanol の添加によって、cyclohexanol のピーク面積が増加した。その一方で、他の 6 成分のピーク面積は、いずれも減少していたことがわかる (**Figure 4-2-4**)。第 2 節の HepG2 細胞の VOCs バイオマーカーの実験は、1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde、benzyl alcohol は、増加傾向、cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol、4,4,5-trimethyl、1-undecanol は、減少傾向を示したにもかかわらず、HepG2 細胞フリーな DMEM 培地と比べ、1-butanol 添加後の DMEM 培地から検出した cyclohexanone、

1,3-dioxan-5-ol-4,4,5-trimethyl、1-undecanol、benzaldehyde、benzyl alcohol、phenol のピーク面積は、減少したことがわかる。減少傾向の cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol, 4,4,5-trimethyl、1-undecanol、phenol の 4 種類化合物の薬品添加 DMEM 培地は細胞なしの DMEM 培地より随分低くなるのが見られた、それは薬品の添加による DMEM 培地中の各成分のバランスを崩したと考えられる。1-Butanol の添加による HepG2 細胞の VOCs 代謝の影響があったものの、その詳細なメカニズムについて今現在まだ解明に至っていないが、これから検討していく必要がある。

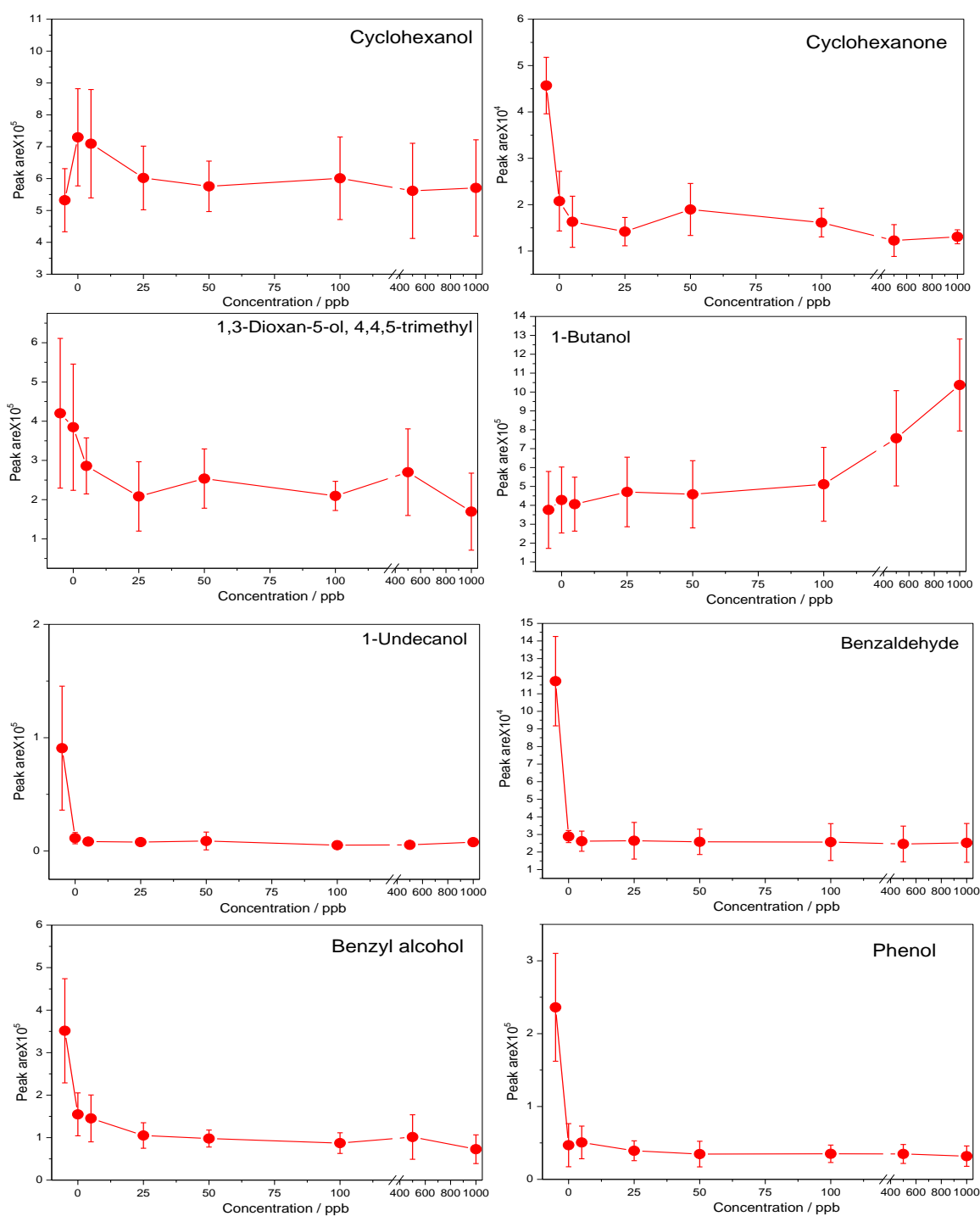


Figure 5.2.4. Changes in VOCs metabolism of HepG2 cell by addition of 1-butanol.

5.2.3.3 HepG2 細胞 VOC 代謝の PCA 解析

これらの成分に基づいて主成分分析を行うと、結果を **Figure 5.2.5** に示している。細胞培養実験では、培地中の各化合物のピーク面積の変化量を示し、それらの化合物の変化に基づいて主成分分析を行うことで細胞培養と細胞なしの培地の分離が成功した。しかし、異なる 1-butanol 濃度の投与サンプルの分離ができなかった。

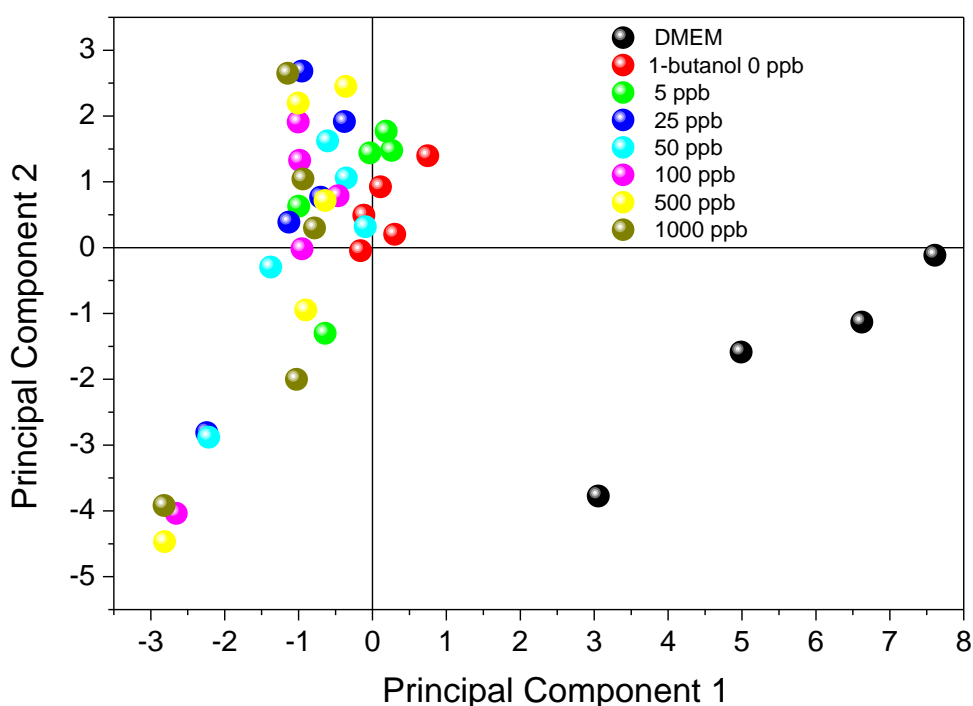


Figure 5.2.5. Analysis of VOCs components involved in HeLa cell metabolism by PCA score plot.

5.2.3.4 ガス状の 1-butanol の暴露による HepG2 細胞代謝変化

1-Butanol (5 ppm 水溶液中)の暴露による HepG2、A549 および HepG2 の細胞数変化を **Figure 4.2.6** に示し、それぞれ、6, 4, 4 世代を継続に培養した。HepG2、A549 および HepG2 がん細胞は、1-butanol (5 ppm 水溶液中)の蒸気暴露によって、それぞれ、

平均的に約 15%, 5%, 25% が減少した。HeLa と HepG2 細胞の減少は、比較的に安定しているが、A549 細胞は、ある世代が急激に細胞数の増加が確認された。HepG2 細胞は、そのバイオマーカーとなる 1-butanol (5 ppm 水溶液中) の蒸気暴露によって選択的に細胞数の減少が起こったと考えられる。

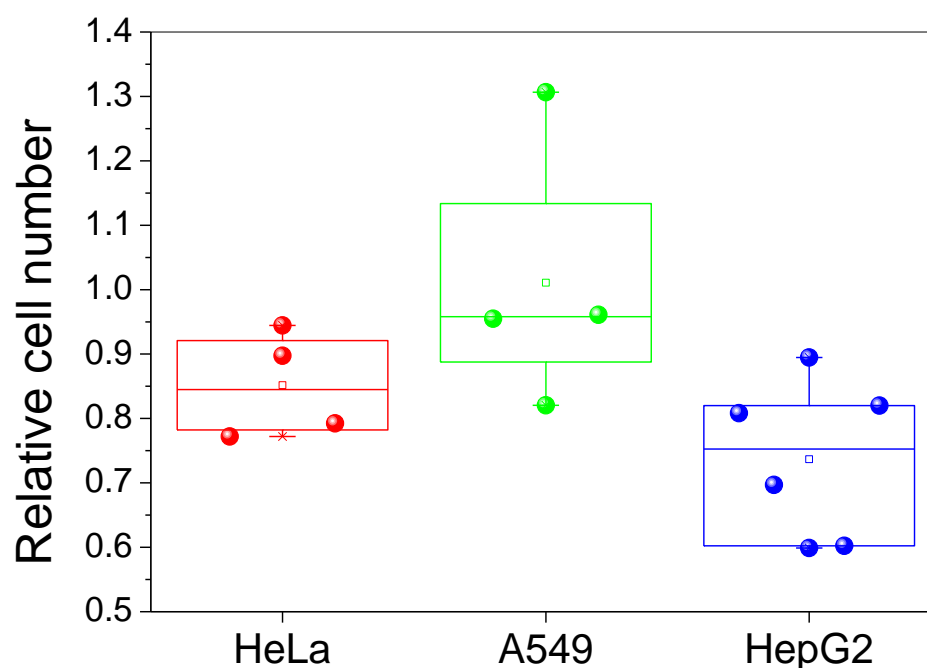


Figure 5.2.6. Relative cell number of HepG2 and HeLa, A549 cells after exposure to 1-butanol (5 ppm in aqueous solution).

5.2.3.5 VOC バイオマーカーの蒸気暴露によるがん細胞の VOCs 代謝の変化

1-Butanol (5 ppm 水溶液中) の暴露後の VOC 成分を **Table 5.2.2** に示した。HepG2 細胞は、連続に 6 世代培養して、暴露サンプルと非暴露サンプルの数が共に 18 である。暴露前後の VOC 成分の p-value を求め、結果の有意性を調べ

た。暴露後に、合計 43 成分が検出された。 p -value が 0.05 以下である VOC は、18 成分となった。また、新たに 9 成分が排出されたことがわかった。有意性のある VOC 成分を分けて、暴露前後のピーク面積の比較を行い、その結果を **Figure 5.2.7** に示す。1-butanol は、72 時間の暴露後に、相対量が約 4 倍増えている。以上の結果から、1-butanol の暴露は、HepG2 細胞の VOCs 代謝経路に参加し、代謝成分の大きく変更したと考えられる。

Table 5.2.2. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after exposure to 1-butanol gas (5 ppm in aqueous solution).

No.	Compounds	Retention time, min	Selected ion, m/z	p -value
1	<i>Ethanol</i>	6:10	31	0.001
2	<i>2-Pentanone</i>	6:28	43	0.046
3	<i>3-Hexanol</i>	6:50	59	0.018
4	<i>Hexanal</i>	7:39	56	0.03
5	1-Propanol, 2-methyl-	7:55	43	X
6	<i>3-Penten-2-one, 4-methyl-</i>	8:27	83	0.001
7	<i>2,3-Butanediol</i>	8:40	45	0.001
8	<i>1-Butanol</i>	8:46	56	0.001
9	<i>3-Buten-1-ol</i>	9:02	42	0.01004
10	<i>Heptanal</i>	9:08	70	0.0098
11	<i>3-Hexanol</i>	9:23	59	0.001
12	1-Methoxy-2-propyl acetate	9:43	43	X
13	<i>Octanal</i>	10:41	43	0.019
14	2-Butanone, 3-hydroxy-	10:49	45	0.16
15	<i>Cyclohexanone</i>	10:59	55	0.0078
16	Propylene Glycol	11:10	45	0.16
17	Furan, 2-butyltetrahydro-	11:11	71	X
18	3-Octanol, 3,7-dimethyl-, (+)-	11:34	73	0.402
19	1-Hexanol	11:37	56	X
20	<i>2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-</i>	11:55	43	0.05002

21	<i>Nonanal</i>	<i>12:12</i>	<i>57</i>	<i>0.0016</i>
22	Cyclohexanol	12:27	57	0.97
23	2-Butoxyethyl acetate	13:05	57	X
24	1-Hexanol, 2-ethyl-	13:30	57	0.92
25	Benzaldehyde	14:10	77	0.063
26	2-Methoxy-1,3-dioxolane	14:49	45	0.103
27	<i>1-Butanol, 3-methoxy-, acetate</i>	<i>16:15</i>	<i>59</i>	<i>0.028</i>
28	1,3-Butanediol	16:38	45	0.44
29	2,5-Hexanediol, 2,5-dimethyl-	16:57	59	0.16
30	<i>Benzenemethanol, α-methyl-</i>	<i>17:36</i>	<i>79</i>	<i>0.001</i>
31	Benzyl Alcohol	18:17	79	X
32	<i>Dimethyl sulfone</i>	<i>18:33</i>	<i>79</i>	<i>0.001</i>
33	2-Benzyloxy-3-methyl-1,4-butanediol	18:40	91	X
34	(S)-(+)-6-Methyl-1-octanol	19:09	69	X
35	<i>Phenol</i>	<i>19:34</i>	<i>94</i>	<i>0.041</i>
36	Heptanoic acid, methyl ester	19:49	74	0.063
37	Hexadecanoic acid, methyl ester	21:47	74	0.58
38	Cyclohexanecarboxylic acid, butyl ester	22:12	129	X
39	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	22:28	191	0.16
40	1-Tetradecanol	23:20	69	0.18
41	Heneicosanoic acid, methyl ester	23:57	74	0.11
42	Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-, cis-	24:04	104	0.52
43	Niacinamide	24:09	78	0.51

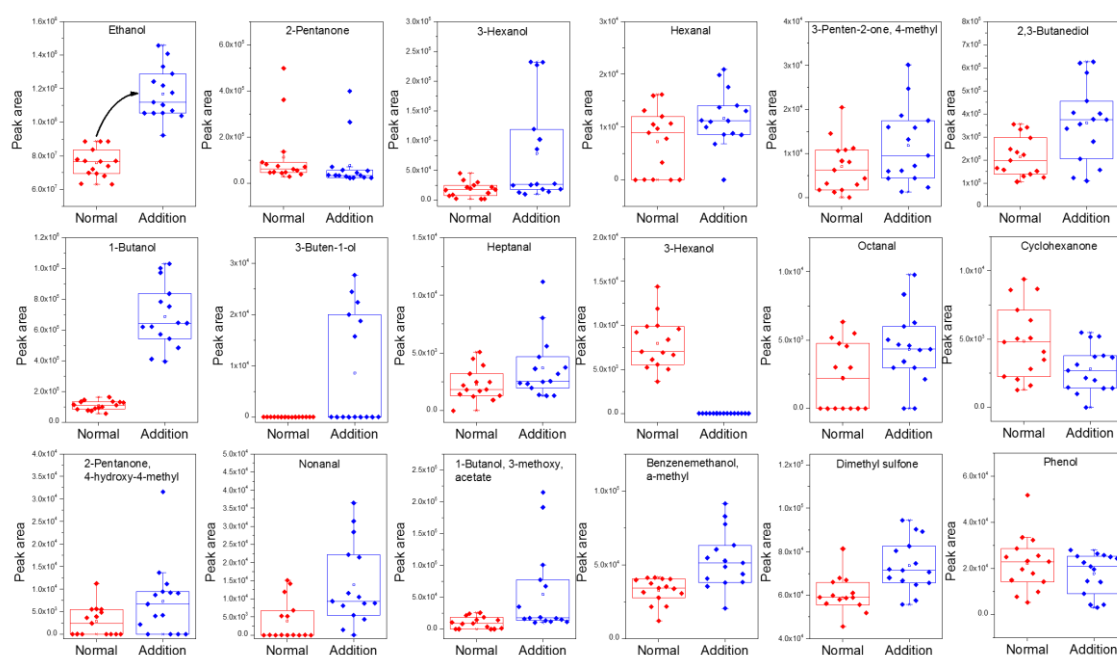


Figure 5.2.7. Peak area comparison of VOCs metabolic components of HepG2 cell line (red) before and (blue) after exposure to 1-butanol (5 ppm in aqueous solution) gas via ZSM-5/PDMS composite thin film.

5.2.3.6 VOC 蒸気暴露による VOC 代謝変動の PCA 解析

Figure 5.2.8 に 1-butanol (5 ppm 水溶液中)蒸気暴露の主成分分析結果を示した。N と A は、それぞれ、普通条件下とガス暴露条件を意味する。HepG2 細胞の培養周期は、約 72 時間のため、暴露と非暴露 HepG2 細胞、または同じ日に対応する条件下で培養した DMEM 培地の PCA 結果を **Figure 5.2.8a** に示し、1-butanol の HepG2 細胞への選択性を確認するために、HeLa 細胞、A549 細胞または、それらと同じ条件下で培養した DMEM との PCA を **Figure 5.2.8b** に示した。それらの結果からは、暴露と非暴露サンプル間に違いがあった。更に、異なる細胞種間、また栽培種と培地間にも違いが見られ、1-butanol ガスの暴露の HepG2 細胞への選択性を裏付けた。

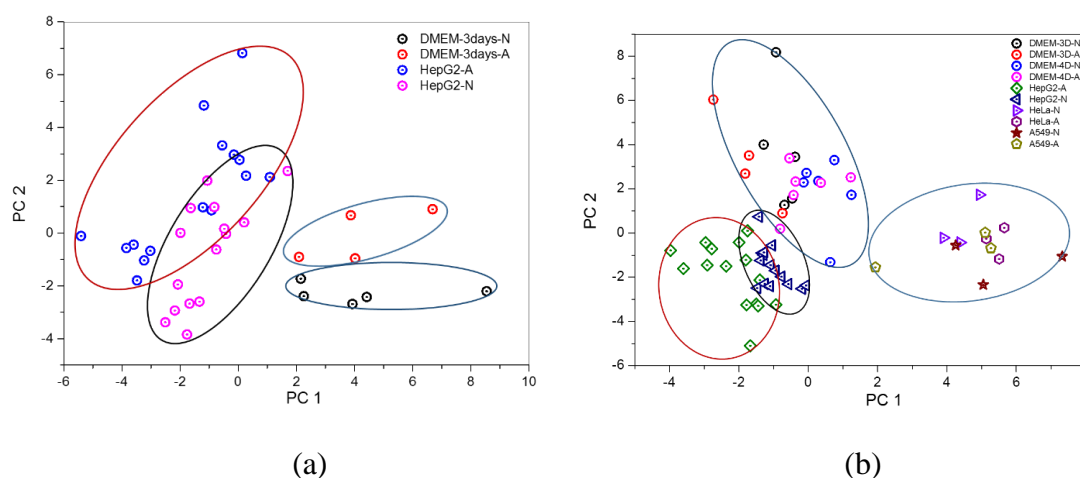


Figure 5.2.8. PCA analysis of VOCs metabolic components of (a) HepG2 cell line and (b) HepG2, HeLa, A549 cell lines before and after exposure to 1-butanol (5 ppm in aqueous solution) gas via ZSM-5/PDMS composite thin film extraction. (Hela and A549 cell normal $n = 3$ and exposure $n = 3$, HepG2 cell line normal $n = 18$ and exposure $n = 18$).

5.2.3.7 高濃度の 1-butanol ガス暴露

これまでに、1-butanol (5 ppm 水溶液中)の暴露実験を行い、HepG2 細胞の細胞数が約 25%減り、その VOC 代謝成分も大きく変わったことがわかった。1-butanol 水溶液の濃度を 50 ppm まで増加し、同じ暴露実験を行い、HepG2 細胞の細胞活動への影響を調べた。

HepG2, A549,および HeLa 細胞は、連続に 5 世代培養を行った。1-butanol (50 ppm 水溶液中)の暴露によって、HepG2 細胞の数は、約 20%減少した (**Figure 5.2.9a**)。A549 細胞は、そのガス暴露に影響されずに、細胞数変化が不規則的である。HeLa 細胞は、相対細胞数比率が右下がりであり、世代の推移と共に、細胞数の減少が起こった (**Figure 5.2.9a**)。しかし、暴露後の培地からは、1-butanol の濃度が増加していることがわかった。暴露用の 1-butanol 水溶液は、細胞継代と同時に、交換するようにしている。その原因は、1-butanol ガスは、インキュ

ベーター内の滅菌水に溶け込んで、蓄積する (**Figure 5.2.9b**)。細胞培養の間に、再び細胞培養培地に戻ったことが考えられる。従って、高濃度の場合は、毎回インキュベーター内の滅菌水を交換する必要がある。しかし、このような高濃度の 1-butanol ガスの暴露に関わらず、HepG2 細胞の細胞数は、低濃度(5 ppm 水溶液中)と比べ、更なる減少が確認できていない。50 ppm の 1-butanol 暴露は、効果的な濃度ではないといえる

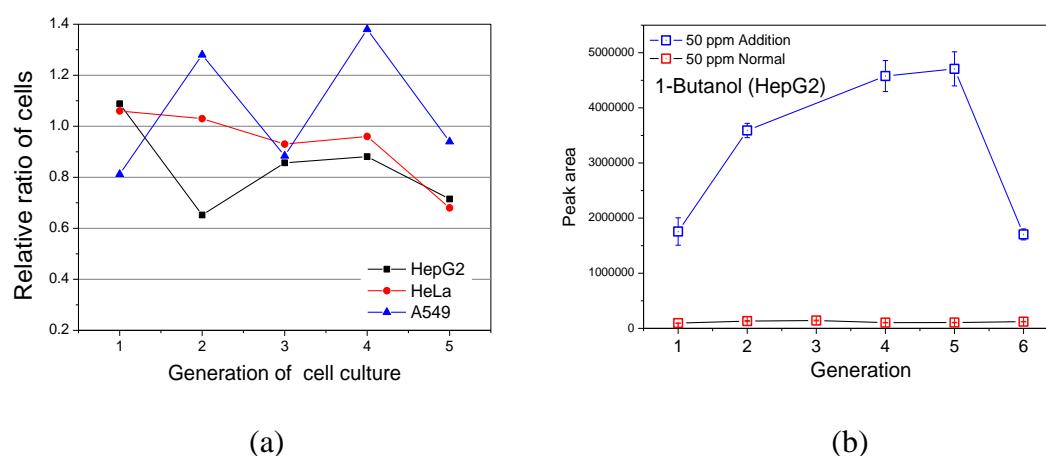


Figure 5.2.9. (a) Relative cell number of HepG2 and HeLa, A549 cell lines after exposure to 1-butanol (50 ppm in aqueous solution). (b) Peak areas of 1-butanol recovered from the cell culture medium under 1-butanol gas exposure and normal culture condition during the continuous culture period of six generations.

5.2.3.8 VOC ガス暴露による HepG2 細胞活性への影響のメカニズム

シェーンハイマーは、重窒素で標識したアミノ酸の一種であるロイシンを含む餌を成熟したネズミに与える実験を行った。重窒素は、尿中排泄されず、体中を構成するタンパク質に取り込まれ、全身のあらゆる組織に分散された。その多くは、腸管や腎臓に取り込まれた。ネズミ体内のタンパク質は、三日で半分が新しいタンパク質に入れ替わっていたことが確認された。重窒素は、ロイシン以外のあらゆるアミノ酸から検出された。

つまり、ネズミ体内に取り込まれたロイシンを腸管から吸収され、更に小さい分子に分解された後に、改めて再配分され必要なアミノ酸に再構築されたとわかる。人体において、日頃摂取する食物は、人体に取り込まれる際に、既存の物質と置き換わるように、摂りこまれる。生物は、既存物質の腐敗・自己崩壊が起こるより、早く物質を新しく入れ換え再構築することで、生命を維持する仕組みになっている。つまり、人体において、新しい物質の流入量と古い物質の排出量が一定で動的平衡を保っている。例えば、人体に有害な物質が取り込まれると、体中に分散して再構築する恐れがある。有害物質を取り込まれた組織とその周辺で腐敗・自己崩壊が速く起こることで、組織の動的平衡が保てなくなり、細胞が癌化し、自己崩壊が起こると考えられる[3]。HepG2細胞の場合は、がん細胞増殖と共に、cyclohexanone が減少し、benzyl alcohol、cyclohexanol、1-butanol および benzaldehyde が増加したことがわかる。つまり、がん細胞は、増殖過程で VOC 排出および取り込みが同時に行われ、生体機能を維持するために、数えきれない低分子が細胞内に取り込まれ、必要な成分の構築に働くなどの作用がある。一方で、細胞内に存在する成分の崩壊が起こりながら、分解した低分子が細胞外に排出される。HepG2 細胞は、DMEM 培地から栄養分を取りながら増殖していくが、細胞増殖過程で成分の出入りが安定な平衡が維持されていると考えられる。そこで、がん細胞が増殖段階で 1-butanol のような低分子成分を投与し、細胞内外における低分子の動的変更を偏らせることで、がん細胞の増殖、活性、代謝に大きな影響を与えることになると考えられる。従来の多くの研究は、がん細胞に低分子代謝物を投与することで、がん細胞のアポトーシスが引き起こされ、がん細胞から VOCs が細胞の崩壊と共に細胞外部に排出される。また、細胞構造である DNA などは、低分子の投与からダメージを受け、崩壊が起こり、VOCs を産出するメカニズムが報告されてきた[2,4,5]。本研究は、がん細胞培養段階に低分子代謝物を投与することで、細胞内部と外部の低分子代謝物の濃度平行を破り、元々排出される成分は、外部濃度が高いため、細胞

から放出されなくなり、外部から同じ成分を取り込むようになる。そのため、がん細胞の低分子代謝が阻害されると同時に、異なる代謝メカニズムを示した。がん細胞培養における低分子の動的平衡は、がん細胞の低分子代謝また細胞活性に大きく影響したと考えられる。

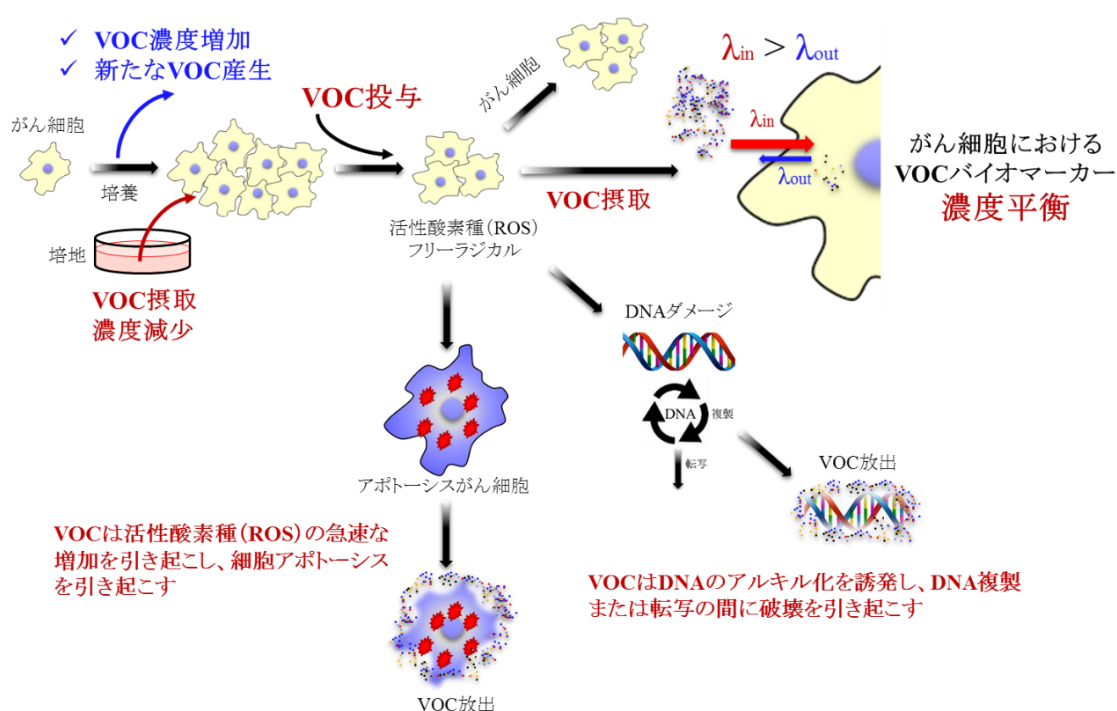


Figure 5.2.10. Mechanism of dynamic equilibrium of low molecular metabolites in cancer cells.

5.2.4 結論

今回の薬品添加実験では、3種類の化合物(1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde)を試みた結果、1-butanol 添加実験では、細胞数の変化が見られ、残りの2種類の化合物は細胞数変化が見られなかった。その原因は、Table 5.2.1 に示すように、1-butanol の水溶解度は、他の2種類の薬品より遥かに大きいことと HepG2 細

胞は、DMEM 培地に増加した cyclohexanol、benzaldehyde を摂取しなかったことが考えられる。Cyclohexanol、benzaldehyde のモニタリングは、肝臓がんの早期発見を可能にできるが、それによる HepG2 がん細胞の死滅に至らないと考える。また、各化合物のピーク面積の変化を調査した結果、薬品添加の各サンプルの主成分分析の分離が見られなかった。その原因は、薬品の添加により DMEM 培地の各成分が減少したと考えられた。以上の結果より、HepG2 細胞培養において、1-butanol がバイオマーカーとして働く効果が確認できた。

1-Butanol ガスを暴露しながら、HepG2 細胞の培養を行った。5 ppm の 1-butanol の暴露によって、細胞数が約 25% 減少し、6 世代の連続培養によってその再現性を確認できた。1-butanol ガスの暴露前後の共通成分に 18 成分が有意性を示し、更に、9 成分が新たに検出された。1-butanol-の暴露は、HepG2 細胞の活動に大きな影響力持っている。また、HeLa と A549 細胞にも同様な暴露実験を行った。1-butanol は、HepG2 細胞に対して選択性を持っている。ところが、高濃度(50 ppm 水溶液中)の 1-butanol の暴露は、細胞の数が約 20% 減少した。連続した 5 世代の細胞培養にとって再現性を確認した。1-Butanol ガスは、滅菌水に溶け込んで、細胞培養液への高濃度の 1-butanol の蓄積が確認された。以上から、適切な濃度の 1-butanol-は、HepG2 細胞の成長を抑制でき、細胞の代謝活動に参加し、影響を与えることがわかった。

第3節

HepG2細胞へのガンボク酸抗がん剤添加を利用した薬理メタボロームアプローチ

5.3.1 緒言

Gambogic acid(GA)は、ポリプレニル化キサントンであり、東南アジアのガルシニア・ハンブリー (*Garcinia hanburyi*) 樹木から分泌されるガンボグ樹脂の主要な活性成分である[1]。GA は、抗炎症やかゆみ止め効果、抗浸潤効果、血管新生阻害、細胞のアポトーシスを誘導するなどの効果があり、がん細胞の抗がん剤として知られている。GA による細胞活性への影響に関する調査は、*in vitro* と *in vivo* の両方で行われている[2]。GA は、肝癌腫、肺癌、上皮性頸部癌、前立腺癌、膵臓癌および胃癌を含む様々なタイプの癌において抗腫瘍効果を示す[3-8]。GA による抗腫瘍活性のメカニズムには、Bcl-2 のダウンレギュレーション、p53 の活性化、c-myc との直接的な結合、受容体の転移および血管内皮増殖因子 (VEGF) シグナル伝達の遮断が含まれる[9-10]。

ここで、HepG2 細胞に GA を添加し、培養後の VOC 変化を調べる。GA のような抗がん剤による HepG2 細胞の VOC 代謝への影響を調べる。ZSM-5/PDMS 複合膜による抽出以外に ZSM-5/PDMS のミニディスクを細胞培養液に入れ、培養と共に抽出活動を同時に進行させる。結果として、水溶液からの抽出時間の短縮を可能にした。更に、抽出の間に起こり得るがん細胞培養試料の汚染が克服できると期待する。

5.3.2 実験操作

5.3.2.1 抗がん剤の添加による HepG2 細胞の VOCs 代謝物の分析

ガンボジック酸 (GA) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0.25mg / mL の最終濃度として、ストック溶液を調製し、バイオフィリーザーに貯蔵した。HepG2 細胞 (5×10^3) を 6.0mL の DMEM 培地中で 24 時間培養した。24 時間のインキュベーション後、HepG2 細胞を異なる濃度の GA (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75mg / mL) を投与し、HepG2 細胞と共にインキュベートした。更に、24 時間後、上清溶液 (5.0 mL) を 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mg/mL の 5 つの濃度の GA を含むインキュベートした DMEM 培地を GC-MS 測定に使用した。HepG2 細胞数を確認するために、血球計数器を使用した。

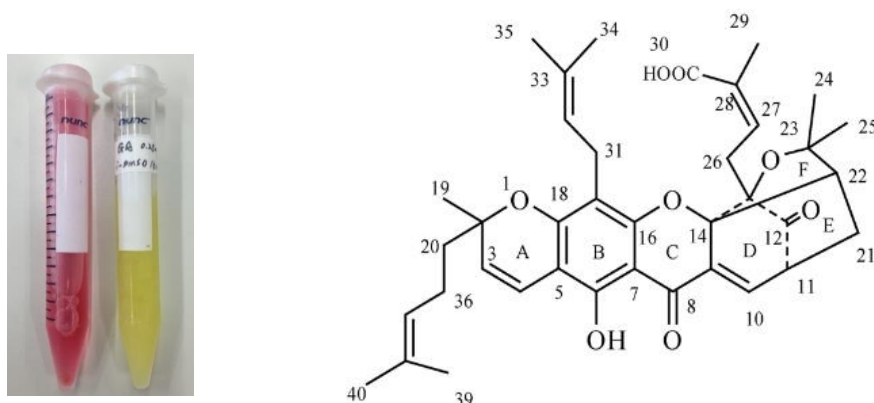


Figure 5.3.1. Structural formula of gambogic acid (GA) and when GA was adjusted with (red) DMEM medium and (yellow) DMSO solvent.

5.3.2.2 ZSM-5/PDMS 薄膜ミニディスクによる抗がん剤の添加後の HepG2 細胞の VOCs 代謝物分析

ZSM-5/PDMS ハイブリッド膜のミニディスクは、直径が 10 cm の細胞培養デイスコに 20 wt% の ZSM-5/PDMS 混合物を 1.0 mL 垂らし、室温で 3 日間乾燥

した後、バイオパンチで直径約 0.8 cm になるように、切り取って 100 度で 1 h 加熱した。使用する前に、メタノールで十分に洗浄を行った。

ガンボジック酸 (GA) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、0.25mg / mL の最終濃度として、ストック溶液を調製し、バイオフィューザーに貯蔵した。HepG2 細胞 (5×10^3) を 6.0 mL の DMEM 培地中で 24 時間培養した。24 時間のインキュベーション後、HepG2 細胞を異なる濃度の GA (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mg / mL) を投与し、HepG2 細胞と共にインキュベートした。同時に、ZSM-5/PDMS ミニディスクを細胞培養ディッシュに入れた。24 時間インキュベートした後、血球計数器を使用し、HepG2 細胞の数を確認した。ZSM-5/PDMS ミニディスクは、ディッシュから取り出して、水による洗浄、窒素乾燥した後、1.5 mL のバイアル管に入れ、50 μ L の抽出メタノールを 5 分間室温にて脱離し、メタノール 1 μ L を取り、GC-MS 測定に使用した。

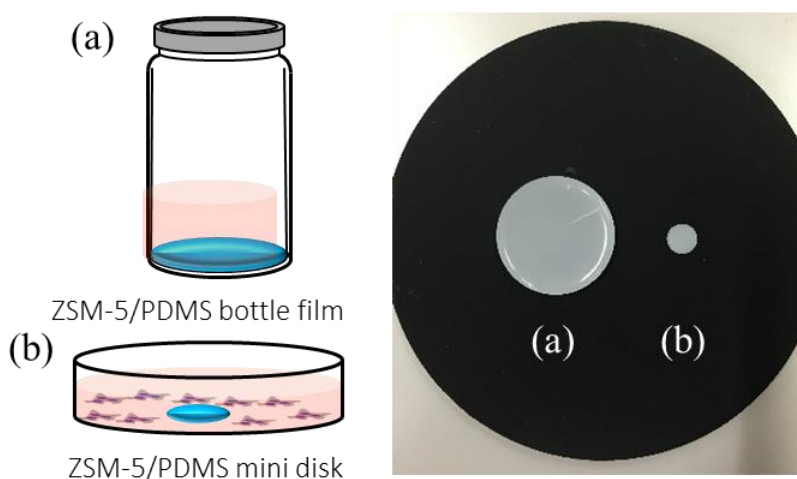


Figure 5.3.2. GC-MS analysis of VOCs metabolic components of HeLa cells via (a) ZSM-5/PDMS composite bottle film and (b) ZSM-5/PDMS composite midi disk.

5.3.3 実験結果および考察

5.3.3.1 抗がん剤の添加による HepG2 細胞の VOCs 代謝物の分析

Figure 5.3.3 の実態顕微鏡から観察した HepG2 細胞の写真を示す。GA の濃度増加と共に、HepG2 細胞の死細胞が増えていることがわかる。

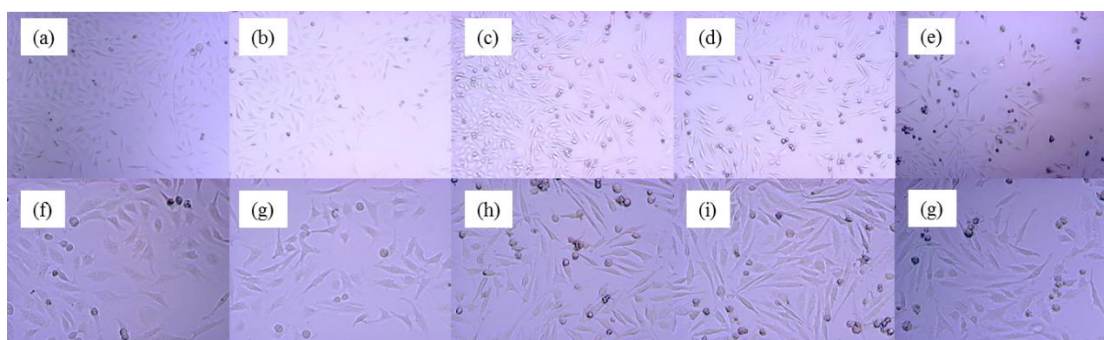


Figure 5.3.3. Stereomicroscope images of HepG2 cells cultured with (a,f) 0 and (b,g) 0.1, (c,h) 0.25, (d,i) 0.5, (e,j) 0.75 $\mu\text{g/mL}$.

トリプシンで培養ディッシュから HepG2 細胞を回収し、血球係数版にて細胞数を確認するところ、HepG2 細胞は、GA の濃度に依存して細胞数が減少した。 1×10^5 cell/dish の細胞を播種したが、0.75 $\mu\text{g/mL}$ の GA の添加によって、細胞数が播種前と変わらなくて、HepG2 細胞の増殖が抑えられた。GA の投与量の増加と共に、HepG2 細胞数が減少し、0.75mg / mL の GA の投与によって、HepG2 細胞数は、80%減少した (**Figure 5.3.4**)。

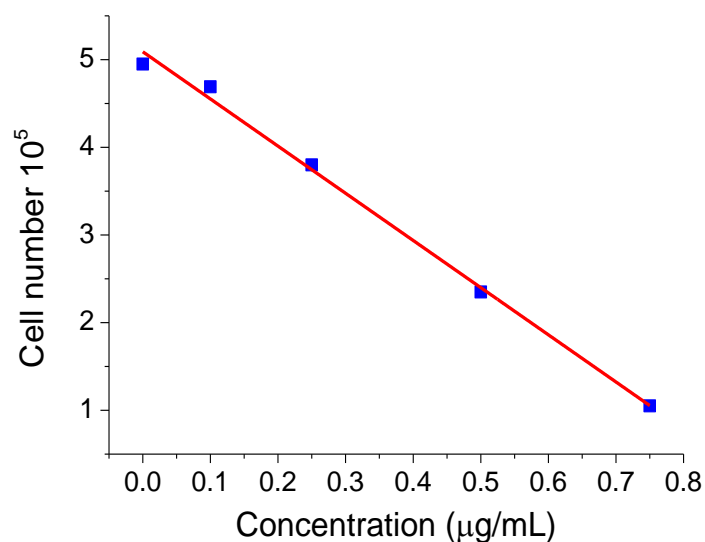


Figure 5.3.4. HepG2 cell number after cultured with different concentration of GA.

Table 5.3.1. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after cultured with different concentration of GA.

No.	Compounds	R.T	m/z	SM	DMEM	HepG2 GA 0 µg/mL	HepG2 0.1 µg/mL	HepG2 0.25 µg/mL	HepG2 0.5 µg/mL	HepG2 0.75 µg/mL
1	Ethanol	6:05	31	975	35834662	42015060	34736731	42606705	42519491	48503298
2	2-Pentanone	6:28	43	835	42745	42579	52408	48815	29050	23106
3	3-Hexanol	6:51	59	897	0	340280	240895	303701	297385	250632
4	1-Propanol, 2-methyl-	7:58	43	760	0	17937	12812	19403	15694	20177
5	2-Propanol, 1-methoxy-	8:43	45	918	243976	337550	268487	327476	285920	280232
6	1-Butanol	8:47	56	847	123445	159464	122544	149584	133730	127821
7	3-Hexanol	9:25	59	752	10783	9145	7676	7683	5891	5616
8	Octanal	10:40	43	616	3329	2351	2436	2163	3052	1211
9	2-Butanone, 3-hydroxy-	10:50	45	700	13450	24203	17746	24348	18731	19512
10	Cyclohexanone	10:58	55	700	20627	14642	17610	14766	17638	14749
11	Propylene Glycol	11:10	45	700	24127	14108	18229	11207	22695	11063
12	Nonanal	12:10	57	739	10898	5832	4816	9968	16331	10493
13	Cyclohexanol	12:26	57	932	370715	479587	401165	443818	418465	343116
14	1-Hexanol, 2-ethyl-	13:27	57	804	84335	70965	59061	64231	62450	68517
15	2-Propanol, 2-methyl-	14:04	59	768	0	69028	39671	68743	51213	54033
16	Benzaldehyde	14:05	77	759	36564	0	0	0	0	0
17	Propane, 2-ethoxy-	14:47	45	700	20196	15901	7701	7701	12083	6879
18	Dimethyl Sulfoxide	14:55	63	926	0	0	16980024	46235388	98176666	150703588
19	1-Butanol, 3-methoxy-, acetate	16:16	59	809	0	316682	212253	337975	269485	252765
20	1,3-Butanediol, (S)-	16:36	45	621	22441	29534	35251	37315	42600	26346
21	1-Penten-3-one	16:57	55	669	20369	0	0	0	0	0
22	Benzyl Alcohol	18:17	79	707	18228	59257	45837	59959	49798	52977
23	Dimethyl sulfone	18:34	79	659	41747	50880	78526	104573	98869	144418
24	Phenol	19:33	94	848	67023	97417	63833	100314	89484	116225
25	Decanoic acid, methyl ester	19:49	74	687	14446	15292	11520	9947	8147	7044
26	2-Methylheptanoic acid	21:37	74	647	30264	15594	15498	16883	12088	13726
27	Hexadecanoic acid, methyl ester	21:48	74	862	269965	287620	237085	188815	173410	133276
28	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	22:27	191	740	50560	63576	60487	67952	64010	51841
29	Glycerin	22:33	61	879	15165	0	0	0	174434	7513
30	Diethyl Phthalate	23:24	149	892	316923	284728	321074	279042	234902	196188
31	Octadecanoic acid, methyl ester	23:58	74	853	184567	191505	147447	140521	132889	110929
32	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	24:16	55	834	71154	52039	40355	31705	28060	22458

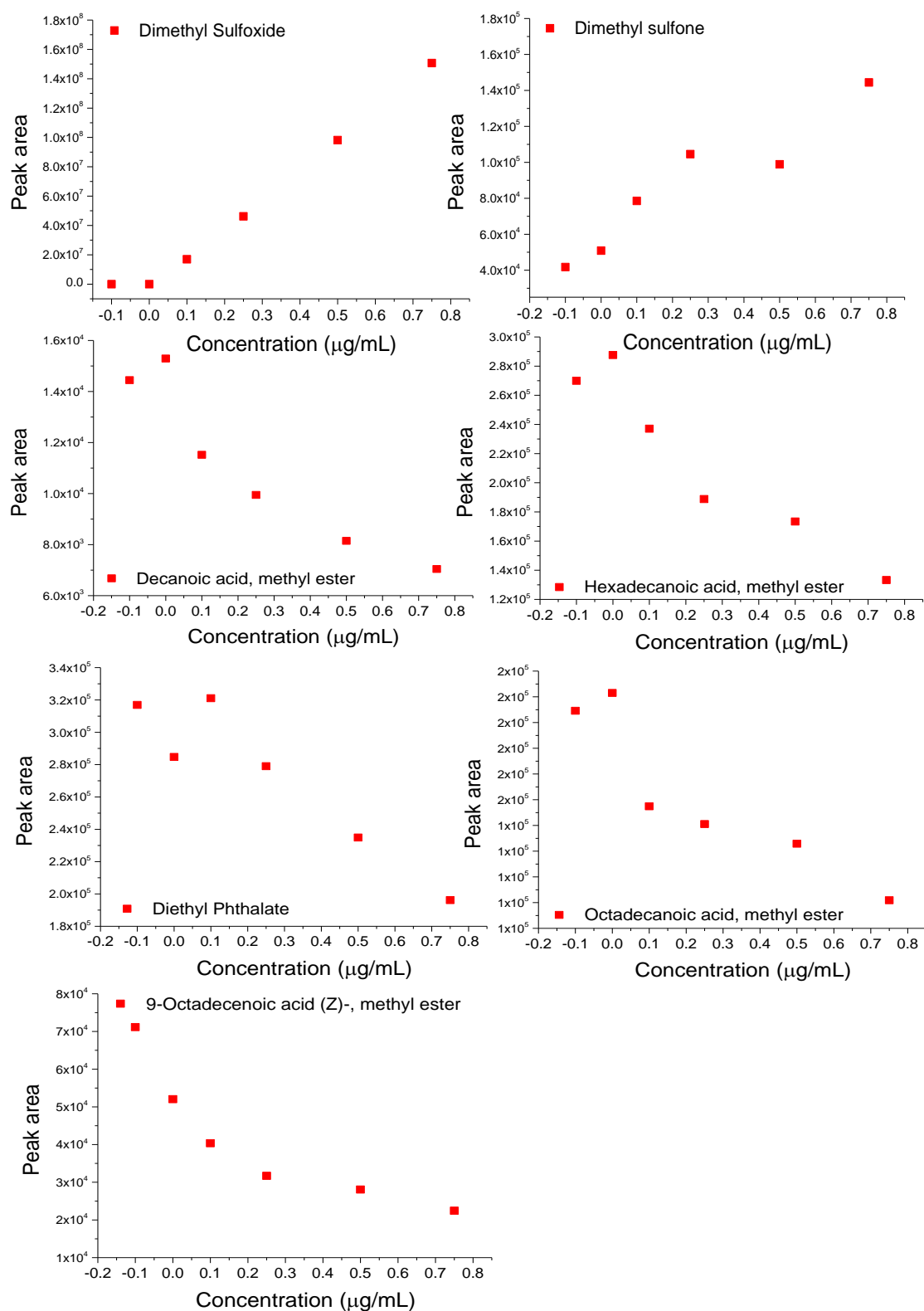


Figure 5.3.5. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that were increased or decreased.

GA の添加によって、HepG2 細胞からの VOC 変化は、**Table. 5.3.1** に示した。Decanoic acid, methyl ester, hexadecanoic acid, methyl ester, diethyl phthalate, octadecanoic acid, methyl ester, 9-octadecenoic acid (Z)-, methyl ester は、GA の濃度に依存し、減少していた。それらの成分は、細胞膜などの細胞自体が持つ成分であり、細胞数の減少によって減少したと考えられる。また、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) と dimethyl sulfone は、増加した。DMSO は、GA の溶媒として、添加量を増やしたために、多く検出された。それらの成分のピーク面積は、**Figure 5.3.5** に示した。

5.3.3.2 ZSM-5/PDMS 薄膜のミニディスクによる抗がん剤の添加後の HepG2 細胞の VOC 代謝物分析

これまでに、所要時間で細胞培養した後の DMEM 培地を回収し、ZSM-5/PDMS ハイブリッド薄膜に入れ、3 時間の抽出を行った。細胞培養と共に VOCs の同時サンプリング手法が必要である。ここで、ZSM-5/PDMS 複合膜のミニディスクを HepG2 細胞培養液に入れ、GA の添加による VOC 成分変化を調査した。

HepG2 細胞培養液に、ZSM-5/PDMS のミニディスクを入れ、更に、GA を添加し、VOC 分析を行った。GA 0.75 $\mu\text{g/mL}$ と同量の DMSO のみを HepG2 細胞に添加し、その影響を調べたミニディスクを細胞と同時に培養すると、ミニディスクが入っていない条件で培養した HepG2 細胞数と比較すると、細胞数が半分ほど減少した。ミニディスクによる汚染または世代間の細胞播種の実験操作の誤差による可能性がある。また、ミニディスクは、DMEM 中の栄養分を吸着してしまい、栄養分が HepG2 細胞に届いていないことが考えられる。抗がん剤の溶媒である DMSO のみの添加は、細胞の数がコントロールと同じ細胞数を持

っている。GA の添加によって、HepG2 細胞数が濃度に依存し減少した (**Figure 5.3.6**)。

Table 5.3.2 に GA 添加後のミニディスクによる VOCs 分析の結果を示す。Decanoic acid-2-methyl、pentadecanoic acid-14-methyl-methyl ester、2-methylheptanoic acid、phenol、benzyl alcohol、1-hexanol、cyclohexanone および 1-butanol は、GA の影響を受けて、減少したことがわかった(**Figure 5.3.8**)。2-tridecanone と benzaldehyde は、GA の添加濃度の増加によって増加または減少していた(**Figure 5.3.7**)。

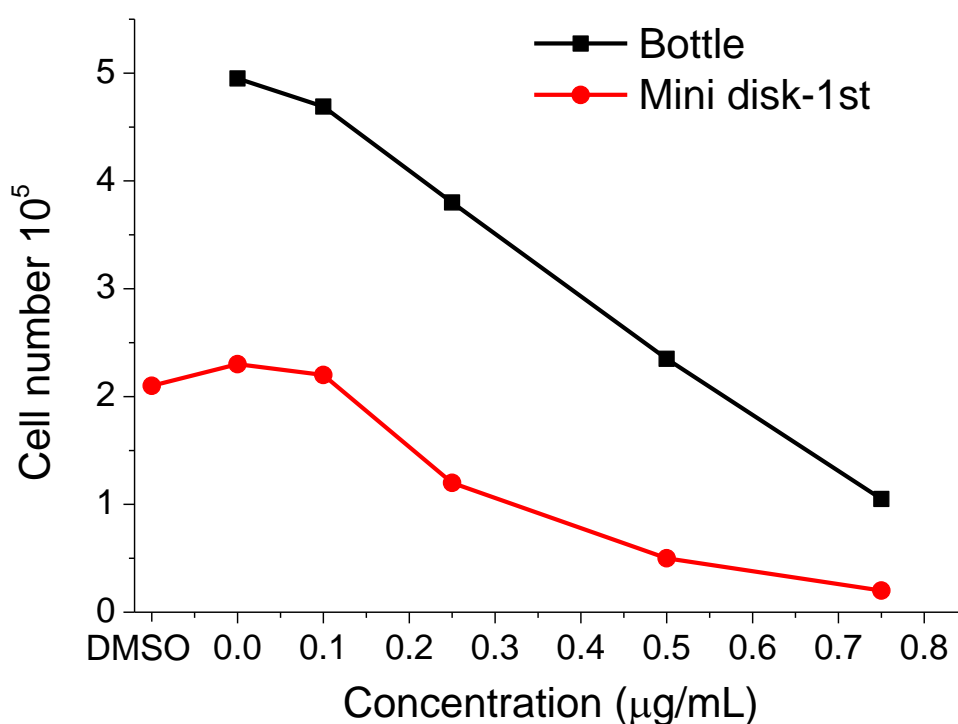


Figure 5.3.6. HepG2 cell number after cultured with different concentration of GA via ZSM-5/PDMS mini disk extraction and bottle film extraction.

Table 5.3.2. List of the VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line after cultured with different concentration of GA via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

No.	Compounds	R.T	m/z	SM	DMEM	DMSO (12 mL)	HepG2 GA 0 mg/mL	HepG2 0.1 mg/mL	HepG2 0.25 mg/mL	HepG2 0.5 mg/mL	HepG2 0.75 mg/mL
1	Ethanol	6:07	31	938	48589413	47002409	51786961	48303807	53584405	48861564	50169074
2	Hexane	6:26	57	816	78080	75151	74864	75573	79243	68727	69207
3	2-Pentanone	6:27	43	814	52332	48192	48582	49652	52080	50245	45681
4	2-Propanol, 1-methoxy-	8:27	45	925	205436	188370	217317	196020	228420	256419	167122
5	1-Butanol	8:37	56	928	126809	106337	130178	112766	120195	115187	90921
6	3-Hexanol	9:19	59	700	10949	6594	8258	7347	7937	7465	5422
7	N- α -Acetylglycinamide	9:43	43	728	9973	5850	8191	10580	11798	7701	4293
8	Styrene	10:17	104	895	121258	82454	113743	89110	88657	93658	61433
9	Cyclohexanone	10:58	55	771	13427	7007	13815	10428	11277	9185	3803
10	1-Hexanol	11:38	56	701	3660	3137	3579	2601	3235	2894	2375
11	Cyclohexanol	12:27	57	826	170467	115846	157703	150665	165306	141245	103220
12	Benzaldehyde	14:12	106	709	110441	26850	20992	32902	41252	46660	46305
13	Dimethyl Sulfoxide	14:56	63	960	0	49723391	0	27639453	38891794	78136826	92094597
14	Acetophenone	15:50	105	819	24774	31080	28767	36815	35632	29299	29151
15	Benzyl Alcohol	18:18	79	700	0	15567	19225	18952	20617	14935	11843
16	Phenol	19:33	94	775	37254	26252	33987	30188	31895	27384	23545
17	2-Methylheptanoic acid	19:48	74	700	14771	18089	18768	17814	17370	11448	14700
18	2-Tridecanone	19:58	58	714	17222	10749	9985	9526	13968	20857	29415
19	Hexanoic acid, 2-methyl-	21:45	74	657	17244	9847	10057	11726	9963	12334	6459
20	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	21:48	74	869	191024	236389	250102	243422	207674	182018	173435
21	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	22:27	191	775	55633	49004	59994	89434	77147	46256	50411
22	Diethyl Phthalate	23:25	149	867	182745	565964	316673	1394333	445522	606217	561376
23	Di-n-octyl phthalate	23:33	149	914	60000	911453	0	632272	1056243	1185424	973605
24	Decanoic acid, 2-methyl-	23:58	74	791	103344	145717	159391	157994	112627	106285	96863

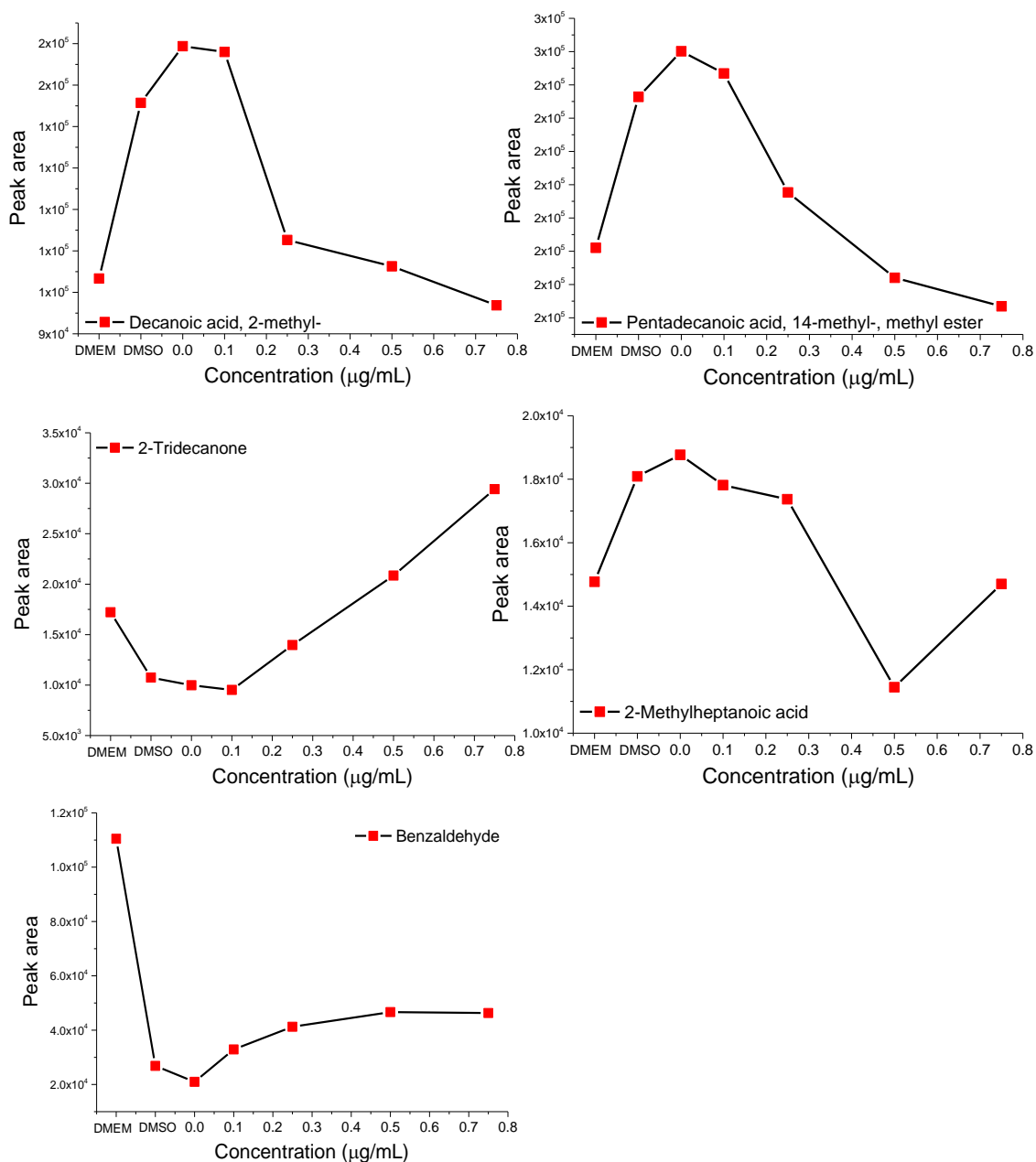


Figure 5.3.7. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that showed concentration dependence via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

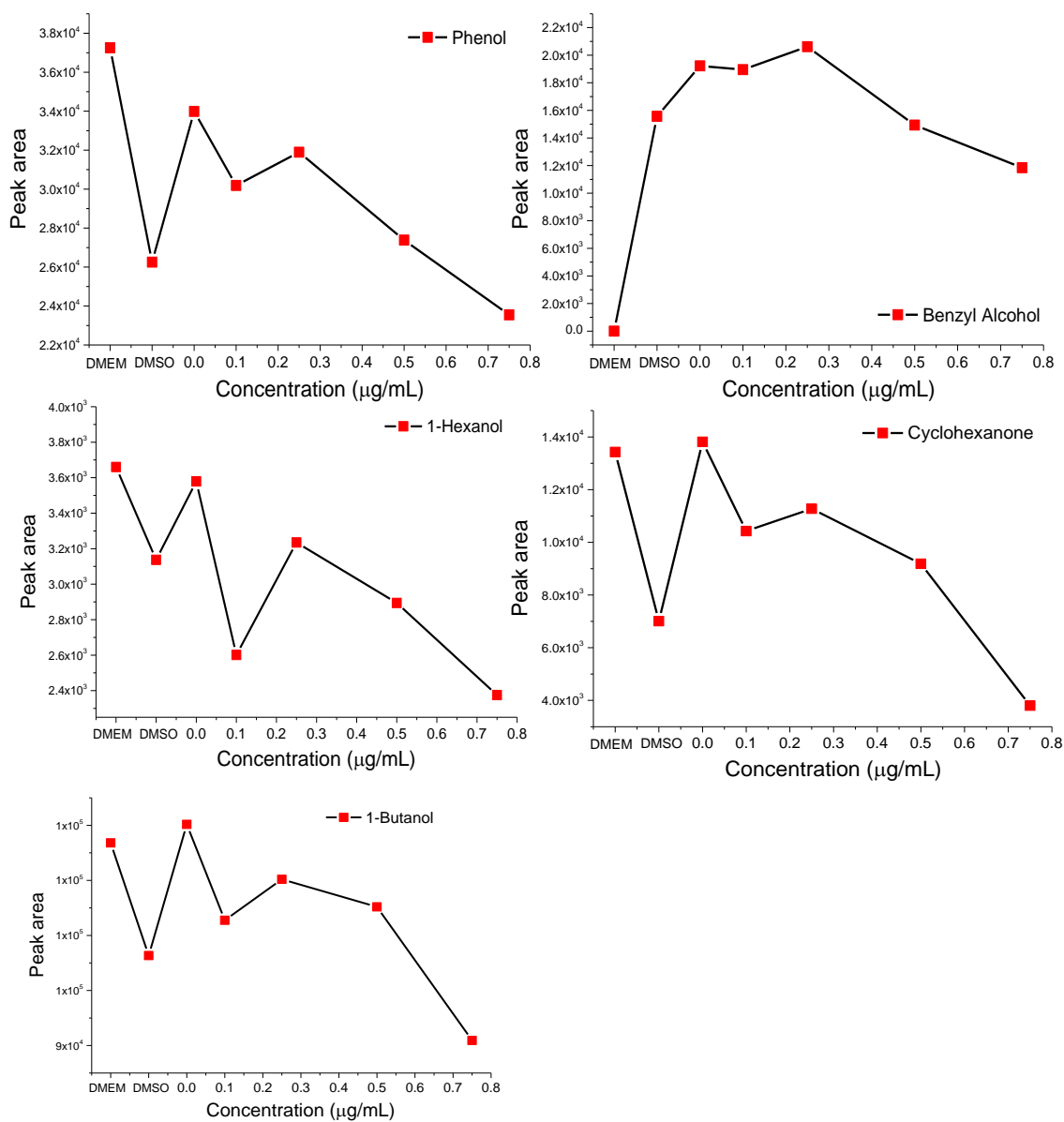


Figure 5.3.8. Peak area of VOCs obtained from the culture medium of HepG2 cell line cultured with different concentration of GA that showed concentration dependence via ZSM-5/PDMS hybrid mini disk extraction.

5.3.4 結論

本節では、HepG2 細胞培養に、抗がん剤である GA を 0、0.1、0.25、0.5、0.75 mg/mL になるように投与し、HepG2 細胞数と VOCs 代謝の両方を調べた。0.75 mg/mL の GA の投与によって、HepG2 細胞がほぼ 100% 死滅したことがわかる。HepG2 細胞培養から、32 成分が検出され、その中で decanoic acid-methyl ester, hexadecanoic acid-methyl ester, diethyl phthalate, octadecanoic acid-methyl ester, 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester は、GA の添加量に比例して、減少したため、これらの VOCs 成分は、HepG2 細胞の潜在的なバイオマーカーである可能性が高い。しかし、第 2 節で説明したように、HepG2 細胞は、1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde、benzyl alcohol の 4 種類化合物は、増加傾向を示し、cyclohexanone、1,3-dioxan-5-ol-4,4,5-trimethyl、1-undecanol、phenol の 4 種類化合物は、減少傾向を示した。GA の投与とこれらの VOCs 成分との関連性が見られなかった。

また、VOCs のサンプリング時間の節約かつ試料の汚染を防ぐために、本節には、ZSM-5/PDMS 薄膜のミニディスクを初めて作成し、HepG2 細胞培養培地に入れ、VOCs のサンプリングと細胞培養を同時に進行させた。その結果、ZSM-5/PDMS 薄膜のミニディスクは、HepG2 細胞培養培地から 24 成分を再現性良く検出し、優れた抽出特性を持つ。GA の投与によって、decanoic acid-2-methyl, pentadecanoic-14-methyl-methyl ester, phenol, benzyl alcohol, 1-hexanol, cyclohexanone, 1-butanol の減少が見られた。Benzylaldehyde、2-tridecanone は、GA の投与濃度に依存して増加したことがわかる。1-Butanol、cyclohexanol、benzyl alcohol は、増加傾向成分が抗がん剤による HepG2 細胞の死滅と共に排出量が抑えられたと考えられる。一方で、HepG2 細胞培養において増加傾向を示した benzaldehyde は、抗がん剤の投与によってその排出量の増加が見られた。つまり、benzaldehyde は、HepG2 細胞数の減少に影響されないことが示唆され、

HepG2 細胞の真の VOCs バイオマーカーではない可能性が高い。同様に、cyclohexanone、phenol は、HepG2 細胞培養の減少傾向を示した VOCs であるが、HepG2 細胞数の減少と共に、増加したため、抗がん剤を投入していない条件と同じ傾向を示した。そのため、cyclohexanone、phenol は、HepG2 細胞の真の VOCs バイオマーカーではない可能性が高い。第 2 節に、HepG2 細胞培養に 1-butanol、cyclohexanol、benzaldehyde を HepG2 細胞培養に投与し、細胞生存率は、低濃度の 1-butanol の投与のみ減少した。従来の抗がん剤と本研究で発見した新たな VOCs バイオマーカーが HepG2 細胞に対して類似した抑制効果があると考えられる。

第六章

疾患における低分子代謝物検出方法の検討

6.1序論

6.1.1低分子代謝物の検出の重要性

人体は、ある意味工場のように呼気、皮膚ガス、体液などが数多くの化学反応を経由し、多様な化学物質を排出している。その中で多くの場合は、高精度で進行し、通常、健康な状態での血液中の代謝物の濃度はほとんど一定の値を示す。しかしながら、E.Jellumが約40年前に提案したように、この生化学プロセスに何らかの欠損が生じた場合(例えば、がんなどの疾患によって)、代謝物の濃度状態が変化するか、もしくは新しい代謝物が生成される[1]。過去10年間にわたって、分子レベルでのバイオマーカーに関する研究が飛躍的に進歩し、がんなどの致死率の高い病気の早期検査や治療への応用が期待されている。

呼気分析は、内因性揮発性有機化合物(VOCs)に基づいた有力な非侵襲的な診断方法の一つである[2]。多くの研究において、がん患者の呼気からがん診断のバイオマーカーとなり得る低分子が報告されている。例えば、1-ブタノール、3-ヒドロキシ-2-ブタノンが肺がん患者の呼気中において濃度を示すことが報告されている[3]。また、呼気に加えて、尿からのものががん診断の重要な情報源となる低分子の疾患マーカーの存在が確認されている。また臭気ではないが、タンパク質の働きに関連して唾液中に溶け込んだアミノ酸の変化と口腔がん、乳がん、膵臓がんとの関連性が報告されている[4]。臭気とはよい香り、悪臭に関わらずに匂いを発している化学物質である。臭気にはアミンやアルデヒド類などのVOCが存在し、これらを検知するガスセンサーの必要性が近年益々高まっている。ガスセンサーの応用分野は非常に幅広く、保安用(火災検知や毒性ガス検知など)、自動車用(触媒機能監視や車内空気換気など)、大気環境用(大気監視や汚染ガス監視ど)、室内アメニティ用(室内空気換気やエアコン制御などの空調)、産業生産用(燃焼制御や包装工程監視など)、

医療用(呼気チェックや疾患発見など)などが挙げられる。特に、特定疾患を示す因子の発見により、医療用へのアプリケーションへの期待が高い[5]。

従来VOCの検出には検出能力が高いガスクロマトグラフィーや液クロマトグラフィーが用いられているが、濃縮プロセスや水などの測定妨害除去プロセスを経るため手間がかかり、なおかつ高いコストなどの問題が挙げられる。その場での連続的な検知を必要とする上記応用分野ではガスクロマトグラフィーは不向きであり、常時検知が可能であるセンサーの開発が重要とされる。また、分析対象の一つである生物学的に重要な分析対象であるアミノ酸は、その低い揮発性から通常ガスクロマトグラフィーでは分析が難しく、一般的に測定前に特定の官能基を誘導化するなどの複雑な処理が必要であることや高価な分析装置などの弱点がある。更に、Maddocksらの報告によると、癌細胞に含まれるアミノ酸であるセリンを奪うことにより、癌細胞の増殖が抑制されると報告した[6]。分子レベルでのバイオマーカー、アミノ酸に関する研究が飛躍的に進歩し、癌などの致死率の高い病気の早期検査や治療への応用が期待されている。生体サンプルを対象とした、高感度・選択的なセンサーデバイスの開発が実現できれば、関連した疾病の簡易的な診断ができ、病気の早期発見と早期治療に繋がるため、医療現場においてその応用が期待されている。

近年、人間の五感に代わる感性センサーに関する研究が盛んに行なわれている。その一つが匂いセンサーであり、食品検査、医療診断、爆薬検知などへの応用が期待される一方、生物の嗅覚に匹敵する実用化レベルまではまだ至っていない。電子鼻を利用してがん罹患や発症との関連性を調査する研究がナノテクノロジーの進歩とともに急速に増えているが、濃縮などの前処理が必要などまだ初期段階であり、より信頼性の高い検知システムの開発が求められている[7]。連続的な常時測定が可能なセンサーとして「電子鼻」技術が利用されている。電子鼻技術とは選択性に幅のあるセンサーをアレイ化して、既知物質測定のセンサシグナルからパターン化を行い、未知物

質測定のスグナルをパターンと照らし合わせて検知するシステムである。近年、電子鼻を利用してがん罹患や発症との関連性を調査する研究がナノテクノロジーの進歩とともに急速に増えているが、濃縮などの前処理が必要などまだ初期段階であり、より信頼性の高い検知システムの開発が求められている[7]。また、まだ感度や選択性が低く(特に、半導体検知素子の場合)、医療(特に人の呼気は湿度80%以上)、室内アメニティ、大気環境などの分析には測定対象に含まれる水(湿度)に強く影響されるなど、まだ多くの課題が残されている。

光ファイバーは、現在、長距離大容量高速通信のバックボーンとして、私たちの生活に欠かせない最も重要な社会インフラであり、コアと呼ばれる高屈折率領域とコアを取り囲む低屈折率領域のクラッドの二重構造となる。通常、光ファイバー内の光はコアの中を全反射して伝搬していくが、コア表面にわずかながら染み出る光があり、その「エバネッセント波」を利用した化学センサーが、耐環境性や遠距離操作性などの特徴から、様々な分野での応用が期待されている[8]。

6.1.2 アンモニア

高濃度のアンモニアガスは、いくつかの疾患と高い相関を持ち、人の健康を脅威する。人間の臭覚によるアンモニアガスの検知限界濃度は、 40 g/m^3 で約50 ppm程度である[9]。しかし、この限界濃度以下のアンモニアガスも呼吸器系、皮膚および眼への刺激性がある。人々が長期的に働くことが許容されるアンモニアガス濃度は、20 ppmである。鼻と喉の即時および重度の刺激は、500 ppmで発生しうる。1000 ppm以上のアンモニアガス中への暴露は、肺内の流体を蓄積させ、肺水腫を引き起こす可能性がある。胸の呼吸と圧迫感の難しさのため、症状が発見されるまでに24時間かかることがある。このような高アンモニア濃度の短期暴露は、死亡または重度の長期的な呼吸器系や肺の障害につながる可能性がある。非常に高濃度(5000~10,000 ppm)のアンモニア

ガスは、5～10分以内に致死が示唆されている。しかし、事故の再構成は、致死量が高いことを実証している。

自然な体の製品として、アンモニアも人間の体内で産生される。生成されたアンモニアの量は、いくつかのパラメーターによって影響される。医学界では、特定の疾患を診断できるレベルの呼気中のアンモニアガスの特定は、患者の乱れた尿素のバランスを迅速に診断する方法である。呼気中にアンモニアを始めとするアミン化合物が含まれていると腎不全や肝臓の代謝不全など消化器系の異常の疑いがあり、健康状態に重大なリスクを引き起こす可能性がある[10,11]。アンモニアガスセンサに関する報告は、数多く存在し、金属酸化物、触媒、ポリマー、光学ガスセンサーなどがある。その中で、一番効果的であるのは、光学ガスセンサーであり、迅速な応答時間また ppb レベルまでの検出限界濃度が魅力的なガスセンサデバイスであり、近年、注目されている[12]。

6.1.3 ポリアミン

ポリアミンは、第一級および第二級アミノ基が3つ以上結合した直鎖脂肪族炭化水素の総称である。ごく例外の細菌を除いてウイルスから微生物、植物、動物のすべての細胞に広く分布するが、一般的にプトレシン、スペルミジン、スペルミンの3種のポリアミンに限定される[13]。1678年、Lecumenhockによって人の精液からリン酸塩の結晶として検出されて以来、その代謝および生理作用の研究が進み、細胞内での分裂増殖や高分子生合成を調節している生理活性物質として働くことが知られている[13]。特に、アミノ基を多くもつため、体内の核酸に対して強い親和力をもつ。1971年に Russelらが、がん患者の尿中ポリアミン量の増加を報告して以来、ポリアミンは、新しい腫瘍マーカーとして注目を集めている[14,15]。ポリアミンの中でも、スペルミンは、尿素回路から生合成される最終ポリアミンであることから、腫瘍マーカーとしての生化学的検出に関する研究が盛んに行われている[16]。現在、電気泳動や高速液体クロマトグ

ラフィーなどの分析法がポリアミンの検出に広く用いられている[17]。しかし、いずれも操作が複雑で測定に時間がかかるため、臨床検査に適切な方法とは言えず、まだ十分な感度が達成されていない。

最近、Fletcherらによって、Pb(II)の蛍光錯体を利用した生体及び非生体ポリアミンの検知が行われた[18]。また、Ikedaらは、モンモリロナイト-超分子ヒドロゲルのハイブリッドを用いたスペルミンおよびスペルミンジンの蛍光検知法を報告した[19]。しかし、両方とも検知感度が低く、実用レベルに達していない。Martínezらは最近、レーザーアブレーション法により合成したAuNPsを用いた、尿中のスペルミンの低濃度(nMレベル)検知に成功している[20]。レーザーアブレーションの光還元によるAuNPsの合成法は、保護剤を使わない合成上の利点を有する。しかし、ポリアミンとの静電相互作用に必要な電荷を作り出すために、塩酸を用いてAuNPsのpHを調整する必要があり、実尿の分析に適した方法とは言えない。一方、表面修飾したAuNPsを用いたアミン化合物の検知に関連して、Zhongら[21]は、一本鎖DNAを被覆したAuNPsを、Liangら[22]はクエン酸とシステアミンを修飾したAuNPsを利用し、それぞれのAuNPsとアミン化合物との静電相互作用に基づいた新しい検知方法の開発を試みた。

6.2 低分子代謝物の検出方法

6.2.1 光学センサーデバイス:長周期格子(LPG)光ファイバー

光ファイバーのコア部分の屈折率がファイバーに沿って周期的に変化する特徴を利用し、もっと積極的に外部環境の変化を屈折率などの光学パラメーターとして捉えることができる。その一つが長周期格子(LPG)光ファイバーであり、LPGの周期によってカップリングされた光は、コアモードからクラッドモードに急速に減衰する(**Figure 6.1**)。その結果、LPG 光ファイバーの透過スペクトルが減衰したバンドとして現れ、この減衰

バンドの変化を利用した様々なセンサーへのアプローチが展開されている。一方、化学センサーとしての応用が比較的に遅れている主な原因として、減衰バンドの変化をもたらすための膜厚の制御が困難であったことが考えられる。このような背景から、近年我々の研究グループでは、シリカナノ粒子とポリマーの交互積層 (LbL) に基づいた LPG 表面への多孔性薄膜の作成に成功し、簡便かつ迅速に膜の厚みや空隙の調整が可能な光ファイバーセンサシステムを初めて提案した[23]。

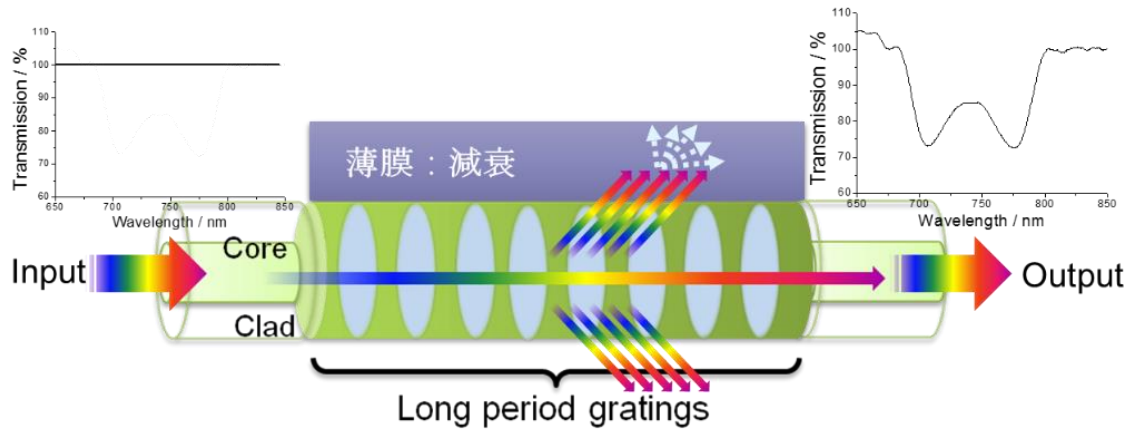


Figure 6.1. Chemical structures of the compounds used for film preparation and schematic illustration of an LPG fiber.

$$\lambda(x) = (n_{\text{core}} - n_{\text{clad}}(x)) \cdot \Lambda \quad (1)$$

$\lambda(x)$ は、直線偏光モードに結合が生じる波長であり、 n_{core} と $n_{\text{clad}}(x)$ は、それぞれコア内を伝搬するモードの実効屈折率とクラディングモードの有効な屈折率であり、 Λ は LPG の格子周期を示す。ファイバーセンサーの高感度は、簡潔に言えば、LPG 光ファイバーの格子周期と LPG 表面コーティングの厚みの両方に大きく影響される。コーティングの堆積に対する LPG の減衰バンドの応答は、クラディングモードがコーティングによって形成された導波路のモードに位相整合されるコーティングの厚さによ

て特徴付けられる。これらの条件の下で、LPG のモード遷移が起こり、残りのクラディングモードがクラディングモードの損失によって残されたギャップを埋めるために再構成される。モード遷移には、モードの実効屈折率の急激な変化が伴う。そのため、LPG の減衰バンドは、堆積した膜の光学特性の変化に対して高い感度を示す領域として現れる。最適な LPG センサー性能のためには、コーティングの厚さがこの領域内にあるべきであることは明らかである。最近の研究では、コーティングの厚さを最適化することに加えて、格子周期を適切に選択することによって感度を高めることが可能であることが示された。これは、LPG センサーが高次クラディングモードに結合するとき、観察される位相整合点で動作するように格子周期を選択することによって達成できる。Figure 6.2 に LPG の高次クラディングモードの位相整合曲線がプロットされている。これらの値は、式(1) 各クラッドモードの共鳴結合波長を計算する[24]。

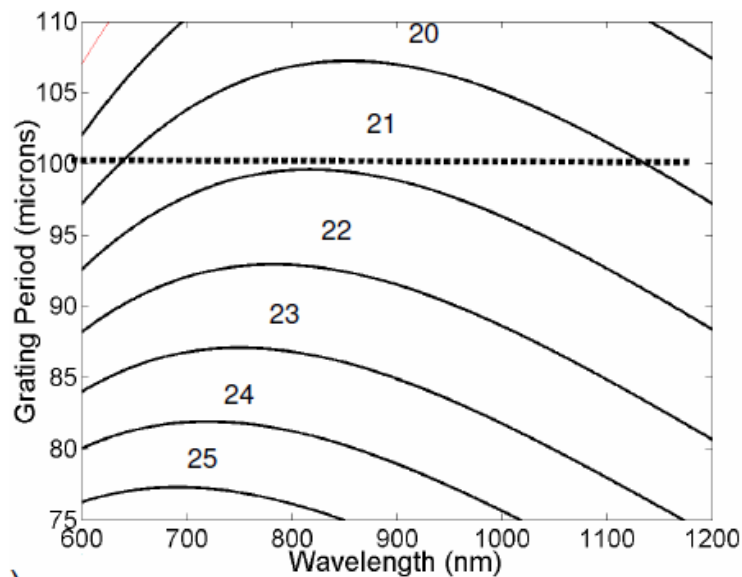


Figure 6.2. The relationship between the grating period and the wavelength at which coupling occurs to a set of symmetric cladding modes (LP_{0,20}–LP_{0,25}), where numbers refer to the order of the cladding mode, LP_{0,x}, assuming that the LPG was fabricated in an optical fiber of a cut off wavelength of 670 nm[24].

LPG 光ファイバーは、減衰バンドの波長および透過率の変動に基づき、ファイバー表面または外部媒質の RI に対し、高い感度を持つことが特徴である。例えば、周期が 100、110.8、110.9、111.1、111.3 μm の長さ 30 mm の LPG 光ファイバーは、670 nm のカットオフ波長を有する単一モード光ファイバー(Fibercore SM750)を共添加ホウ素、ゲルマニウムにして作製した。ポイントごとの方式で、サイド照明周波数 4 倍の Nd から出力光ファイバーを:YAGレーザー、266 nm で動作する。LPG 光ファイバーの応答性を間接に校正するためにスクロース水溶液を用い、ファイバーの特性評価実験を行った。**Figure 6.3a** に示したように、LPG 光ファイバーを 0~80 wt%のスクロースの溶液に浸漬すると、675 および 825 nm 付近にある二つの減衰バンドのシフトが観察されて RI の増加を測定でき、**Figure 6.3b** にまとめた。また、格子周期が 110.8、110.9、111.1 および 111.3 μm の LPG センサーの屈折率測定は、異なる濃度のスクロース水溶液を利用した間接的に確認され、その結果を **Figure 6.4** に示した。

111.3 μm の LPG 光ファイバーセンサーは、60 wt%のスクロースに浸漬時に、二つの減衰バンドが 80、100 のピークシフトを示したため、屈折率に対して最高感度を持っていることがわかる。以上の結果から、LPG 光ファイバーの格子周期は、センサーの屈折率に対する感度を大きく影響することが分かる。

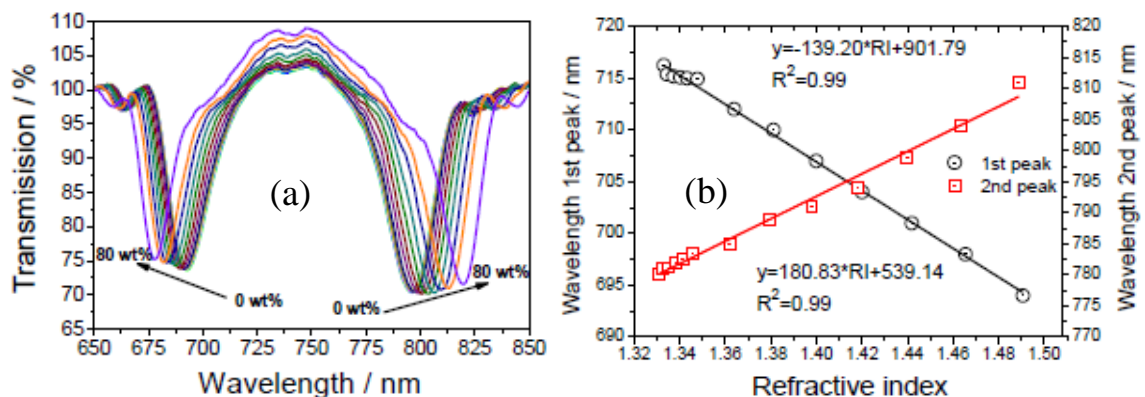


Figure 6.3. (a)Transmission spectra of the LPG (100 μm) in Sucrose solutions of different concentrations. (b)Dependence of the wavelength shift upon the Sucrose concentrations. RI data of Sucrose solutions are taken from the reference.

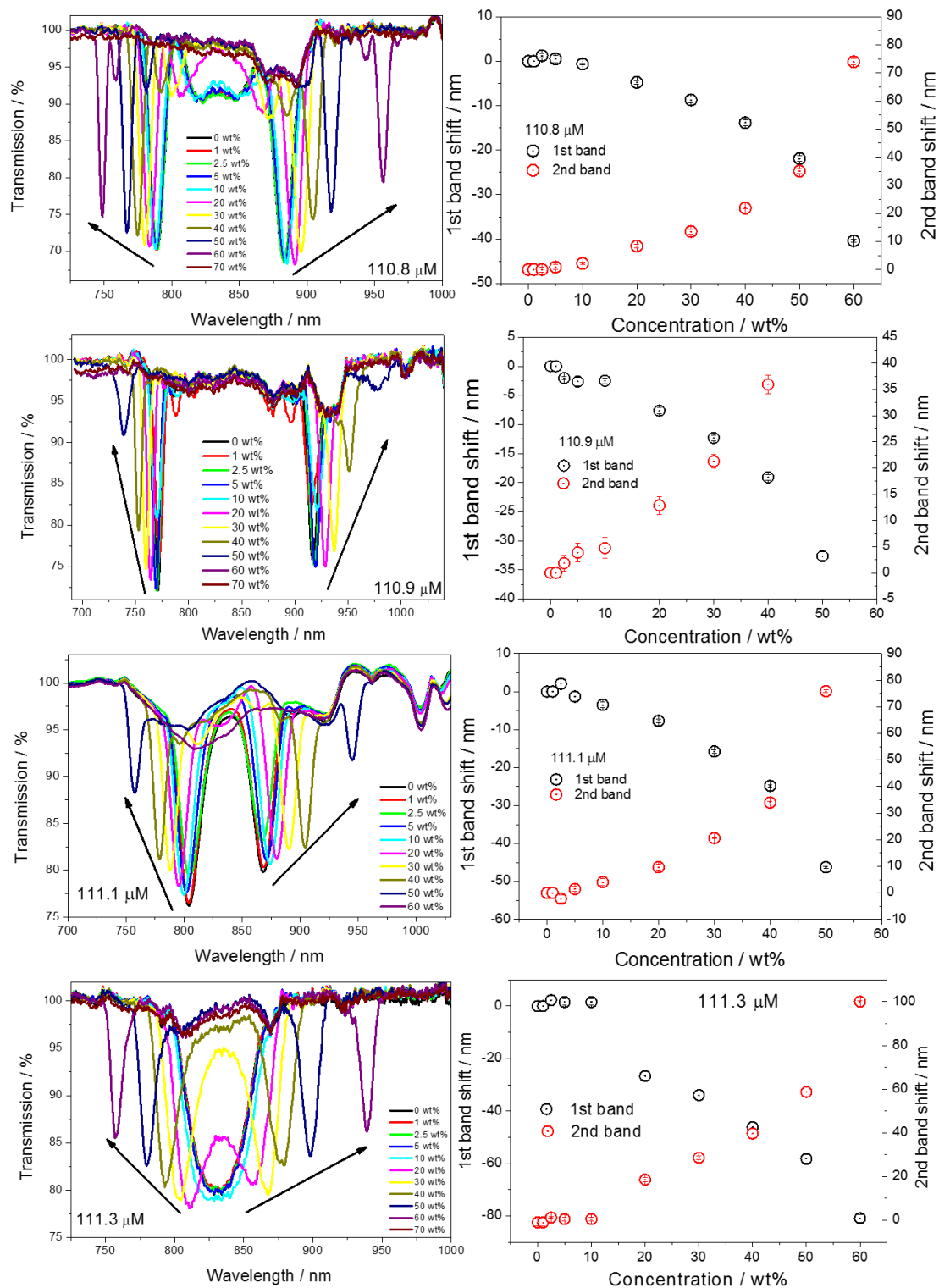


Figure 6.4. Transmission spectra of the LPG (110.8, 110.9, 111.1, 111.3 μm) in Sucrose solutions of different concentrations. Dependence of the wavelength shift upon the Sucrose concentrations. RI data of Sucrose solutions are taken from the reference.

6.2.2 交互積層膜によるセンサー表面修飾

LPGの多孔質コーティングの脱離・吸着が注目されている。ゾルゲル法を利用し、 SiO_2 ナノ粒子をLPG表面に堆積させ、約200 nmの膜厚にしたエタノールガスセンサとして開発された。LPG表面に機能性材料を修飾することで、適切な膜厚と屈折率になり、エタノールガスが膜表面で拡散することが展示されている。その感度が著者たちの予測では、100 ppbである[25]。我々の研究室ではエバネッセント波(EVW)型光ファイバー上に SiO_2 粒子とPoly diallyldimethyl ammonium chloride) (PDDA)の相互積層膜 $(\text{SiO}_2/\text{PDDA})_5\text{PDDA}$ を作成し、膜表面に高機能性材料のポルフィリンTetrathienylporphine tetrasulfonic acid (TSPP)を修飾し、アンモニアガスセンサとして応用する研究を行った。EVW光ファイバー上に $(\text{SiO}_2/\text{PDDA})_5\text{PDDA}/\text{TSPP}$ 膜を修飾することで、約2 ppbの極めて低いアンモニア検出限界濃度が達成できた[26]。光ファイバー上にlayer-by-layer (LbL)法を利用し、シリカナノ粒子と帯電性ポリマーの相互積層膜を作成し、アンモニアガスセンサとして応用が実証した[27]。更に、LPG上に $(\text{SiO}_2/\text{PDDA})_5\text{PDDA}/\text{TSPP}$ 多層膜、 $(\text{SiO}_2/\text{PDDA})_5\text{PDDA}/\text{PAA}$ 多層膜、またPAH/ SiO_2 多層膜を作成し、アンモニアガスを検出できると証明した[28]。光ファイバー上に各種の化学物質を固定することで、ファイバーの厚みと気孔率などを変化させ、センサーとしての効果を高める。注目してほしいのは、上のような膜表目に機能性材料であるポルフィリン(TSPP)のような高機能性化学材料を固定することで、光ファイバーガスセンサとしての感度や選択性などの特性を大幅に高めたことである。

近年、生化学的センシングの目的でナノ薄膜を容易かつ低コストで製造することには、標的検体の効率的な吸着を確保するのに有利であることからかなりの関心が集まっている[29]。Langmuir-Blodgett(LB)[30]、静電自己組織化(ESA)[31]、LbL[32]およびディップコーティング[33]技術などの組織化分子膜の形成のためのいくつかのアプローチが検討されている。その中で、LbL自己組織化技術は、様々なタイプのナノ

構造を製造するのに最も潜在的な方法と考えられてきた[34]。

交互積層法(LbL)とは、正および負電荷を有する物質を静電的相互作用を利用し、交互に積層する方法であり、常温、常圧下においてナノメートルオーダーの均一な厚みの自己組織化薄膜が得られる(**Figure 6.5**)。ナノレベルの組織化できることから注目されているテクニックである[35]。真空蒸着法は、専門的で高価な装置と特殊な固体基板が必要である。溶媒キャスト法は、均一な厚みの膜を作成することが困難であり、スピンドーティング法と同じく基板の輪郭に従わない弱点もある。中で、最も利用されているのは、LB法である。LB法によって作成した膜は、高度に秩序化され、均一な厚みの膜を作成することができる。しかし、いくつかの弱点もある。それは、LB法に用いる固体基板が滑らか、均質、定型でなければならない。また、製造段階において高価な器械が必要であり、前の層にできた欠陥が後続の層によってカバーできないなどである。

LbL法は、とても堅牢、再現可能、低コスト、環境にやさしいなどの利点を有する。常圧・常温条件において操作できることから、真空蒸着法のような高価な装置は必要ではない。以外の方法は、特殊な材料としか組み合わせることができないことに対して、LbL法は、様々な材料(ポリマー、複合材料、粘土、タンパク質、色素、カーボンナノチューブ、ナノ)と組み合わせることができる。また、そのような修飾材料をLbL法を介し、シリカ、金、白金、プラスチック、ガラス、石英、ステンレススチール、粘土、ナノ粒子、血球、コロイド粒子などの表面に修飾することができる。LbLにおけるプロセスは、すべて自動化され、短時間で実行でき、精密に制御したサブナノメートルレベルで均一な厚みの膜などの利点から前例のないテクニックとも評価されておる。

帯電表面上にLbLテクニックを利用し、高分子電解質を沈着する方法は、薄膜の表面特性の高感度、多目的などの利点につながる事が証明された。高分子電解質と表面電荷の静電的相互作用は、高分子電解質の水溶液中からの吸収のため、表面電

荷が反転する。さらに、別のプラス電荷またマイナス電荷を吸収する可能性もある。同様に荷電種と高分子電解質のいずれかを置き換えることにより、タンパク質、無機ナノ粒子の取り込みが可能になる。LbLテクニックは、平面構造に限らず、コロイド粒子コートと多層膜との様々なコンポーネットまた、テンプレート化された粒子の溶解による中空多層カプセルの形成にもつながる。

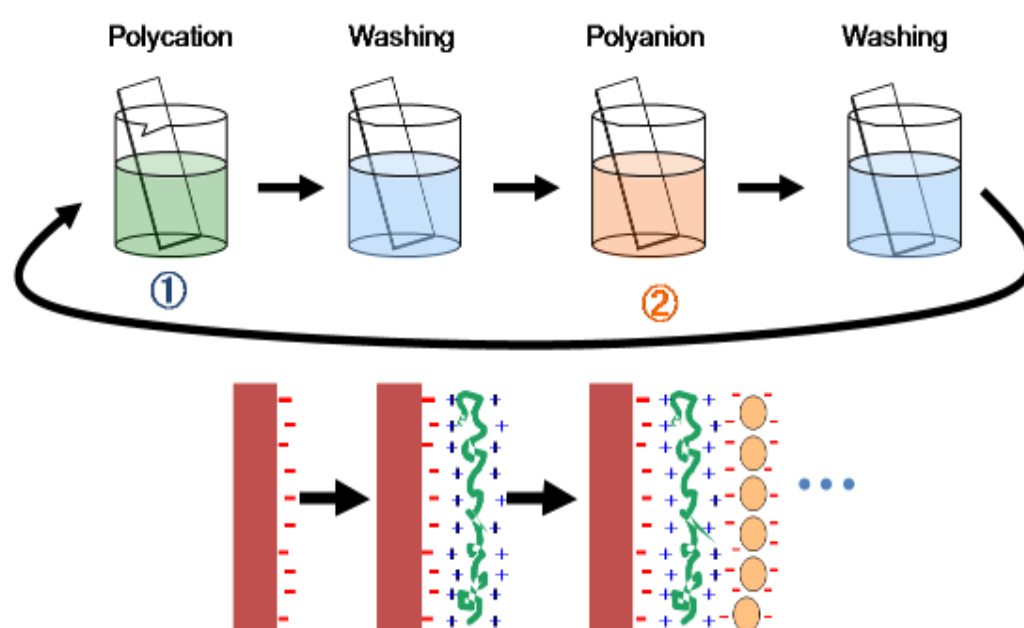


Figure 6.5. Schematic diagram of Layer-by-Layer method.

従来の多層膜は、排他的に強い高分子電解質から形成されるが、弱い高分子電解質から成る多層膜もますます注目されている。LPG のような光ファイバーは、LbL を介し、各種の機能性化学物質を沈着させ、センサーのセンシング特性を増加させることができる。例えば、LPG 光ファイバーを帯電性高分子ポリマーの水溶液中に浸漬することによってファイバー表面でカチオン性とアニオン性ポリマーの静電作用が働き、交互積層膜が形成される。その多層膜の静電的相互作用と LPG 光ファイバーの特有な

屈折率変化を利用し、新規の化学センサーとしての応用が期待されている。

6.3 低分子代謝物の検出

6.3.1 ポルフィリンの光吸収特性に基づいたアンモニアガス検知

ポルフィリンおよびその誘導体は、多くの重要な生化学プロセスにおいて使われる。光合成や酸素の輸送などに深く関連することは、よく知られたことである。効率のよい電氣的また光学的利点を利用して、人工光合成、太陽電池、ガスセンサー、非線形光学、分子電子学、スマートバイオ材料、触媒、水素の光学的製造などの領域で幅広く活用されている。非共有結合の π - π 相互作用、静電的相互作用、水素結合、金属コーディネーションなどがその分子間の駆動力として働く[36]。これらのアッセムブリは、主に二種類に分類できる。それは、J会合体とH会合体であり、それぞれside-by-side、face-to-face構造になっているポルフィリンのJ会合体とH会合体の変化が多層膜の密度、静電的相互作用の強さまたは特定のUV光に対する吸収などの特性と強く関係することから、ますます関心が高まっている[37]。

ポルフィリンは、四つのピロールがメチン基によって結合した環状化合物で、 π 電子の共役した骨格構造を持ち、紫外可視領域に強い吸収帯を持っている。ポルフィン(porphine)骨格にある 12 個の水素原子の一部がメチル基、ビニル基、フェニル基などに置換した化合物の総称がポルフィリン(porphyrin)である。ポルフィリンは、超分子を形成する分子として知られており、代表的な超分子形として J 会合が存在する[38]。分子の一次元鎖を形成する J 会合体と呼ばれる色素分子の集合体は、1936 年に Jelly と Scheibe によりそれぞれ独立に発見され、Jelly の頭文字をもって命名された[39]。この J 会合体は環状ではなく準一次元的なリボン状と考えられており、励起状態が非局在化するという特徴を持つ。

ポルフィリンのピロール骨格には 26 個の π 電子が含まれる。二重結合が共役した多くの共鳴構造が存在するが、そのうち寄与の大きいものは 18 員環の 18π 電子である。この共役 π 電子系は強い芳香族性を備えている[40]。 26π 電子共役系における π 電子の遷移に基づいて、ポルフィリンは紫外～可視波長領域に強い吸収スペクトルを持つ。

ポルフィリンの透過スペクトルは、400 nm に明らかな大環状化合物のエキシマ共役の強力なソレーバンドが観察できる。ポルフィリン単位分子の芳香族特性は、大きな熱安定性、 2^+ 充電状態、ポルフィリンの中心環の π - π 相互作用のために起こるポルフィリンの凝集傾向に大きな影響を与える。最も一般的な会合体の構造は、J 会合体と呼ばれる。ポルフィリンの J 会合体は、酸性条件また有機また無機カチオンが存在するときには発生する。他の凝集構造は、ポルフィリン同士間のスタッキングによって形成される H 会合体である。ポルフィリン凝集体の変化は、一般に透過スペクトル上のソレーバンドのシフトによって観察できる。

ポルフィリンである tetrakis-(4-sulfophenyl) porphine (TSPP) とポリマーの PDDA の相互積層膜は、石英基板、光ファイバー、シリコン基板上への固定が可能であり、前述のようなポルフィリンの凝集は、それらのデバイスに固定しても透過によって明らかな H 会合体と J 会合体の変化が観察できる。しかし、ポルフィリンの吸収スペクトルは、溶剤、酸化還元反応、中心 N_2 原子のプロトン化や金属イオンの錯体化、構造変化(平坦化、歪み)による電子変化、ポルフィリン間の相互作用 (π - π 相互作用、静電相互作用など)などの要素に影響される。

一方、水溶性ポルフィリンの TSPP は、 NH_3 また揮発性有機化合物(VOC)ガスを検出するガスセンサーとして利用された。今回注目したのは、LPG 光ファイバー上に TSPP/PDDA 相互積層膜を作成する研究である。ポルフィリンの明らかな構造変化及び光学的特異性からポルフィリンをセンサーに応用する研究は以前より積極的に行わ

れてきた[41,42]。我々はこれまで、LbL法を利用して作成したポルフィリンとポリマーの交互積層膜を利用した光ファイバー型ガスセンサーの NH_3 センシング能について検討した[43]。簡単な製膜法によって作成し、数百 ppb の NH_3 ガス検知が可能であることが期待できるだけでなく、測定濃度範囲内で高い定量性が示唆された。

ここで、PDDAおよびTSPPから成る多層ナノ組み立てられた薄膜で修飾されたLPG光ファイバーに基づいてアンモニアガス検出のためのセンサーの作製を報告する。センサー感度および選択性は、アンモニアガスおよび潜在的な干渉ガスの異なる濃度の変性LPG装置の露光によって試験した。センサー応答の膜厚さの影響を調べた。また、初めて、我々の知る限り、PDDA/TSPP膜のRI値は、アンモニアガスに暴露する前と後のLPG屈折率測定装置の性質を用いて推定した。

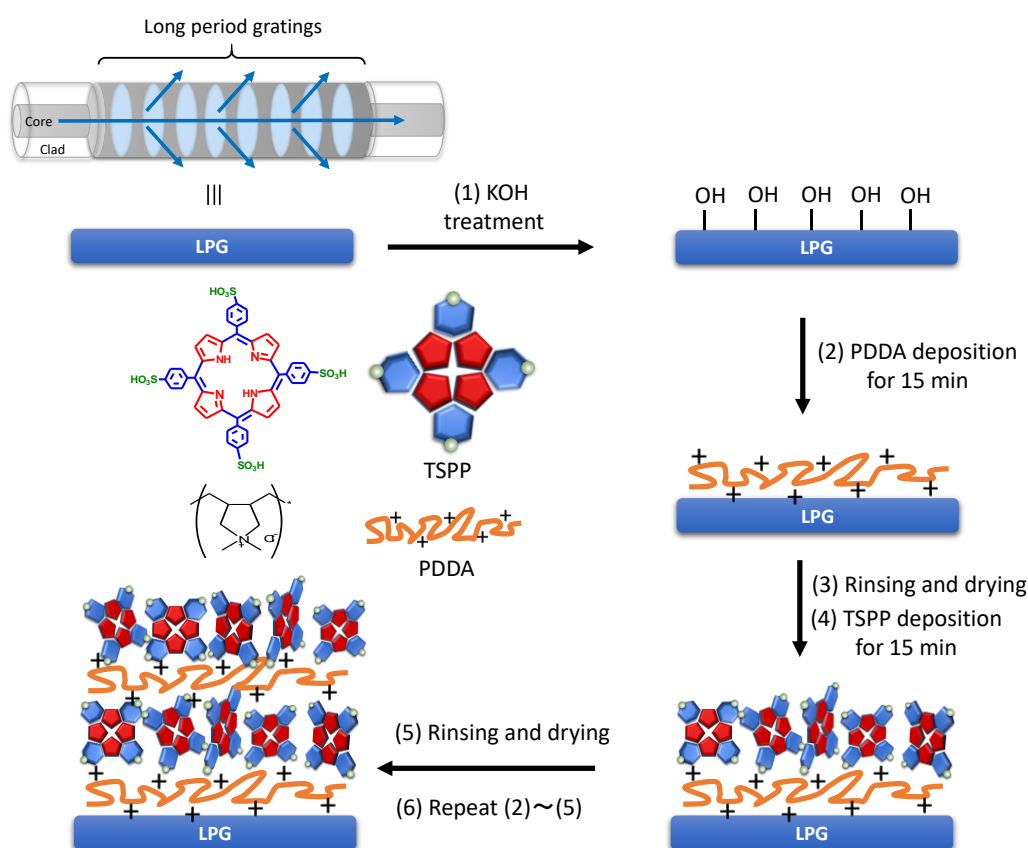


Figure 6.6. Schematic of the deposition of a film containing PDDA and TSPP onto an LPG optical fiber.

Figure 6.7に示すように、PDDA/TSPP薄膜の堆積によってLPGのTSは、劇的な変化を受け、15層膜の堆積の後に、共振帯域の710および794 nm付近にLPG光ファイバーの減衰バンドの二つの共振帯域が観察された。LPG 光ファイバーのTSの変化は、表面のPDDA/TSPP薄膜のRI、光学的厚さ(OT)、及び幾何学的な厚さなどの薄膜の光学特性に影響するパラメーターの変更に起因する。その結果は、以前の報告とよく一致している。薄膜の最外層がTSPPの場合は、LPG光ファイバーの TS 変化が最も顕著であったことから、TSPPの会合体がPDDA層と比べもっと高いRIを有することが示唆された。

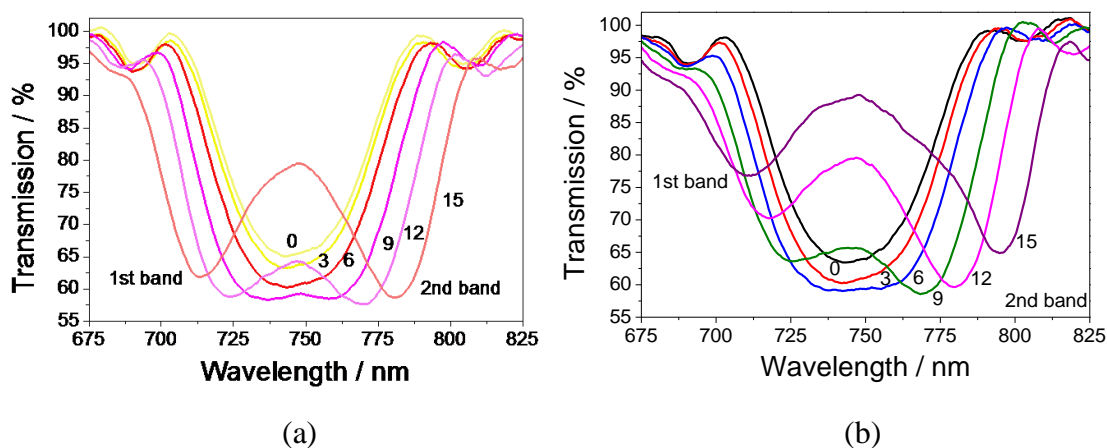


Figure 6.7. Changes in the transmission spectra of the LPG optical fiber as the number of layers deposited (marked next to each line) increased, when the outermost layer was (a) PDDA and (b) TSPP.

Figure 6.8に示したように、水溶液中のTSPPと比較し、PDDA/TSPP交互積多層膜の場合は、H 会合体(430 nm),J 会合体 (485,700 nm)が形成された。それは、溶液中のモノマーが急速に溶解し、反対に帯電するPDDA層表面へ吸着し、HまたはJ会合体の形成に繋がった。それらのポルフィンの会合体の形成は、PDDA層への吸着とJ会合体の形成が表面電荷の飽和を超え、継続し、多層膜の構築に必要な反対な電荷を持ったことを示唆する。また、H会合体の吸収ピークは、1層目の414 nmから430

nmへレッドシフトしたことも過剰な吸着を支持する。交互積層膜を作製する時に、TSPPおよびPDDA層の固定に伴うポルフィリンの会合体変化が観察できた。TSPP層の上にPDDA層を固定すると、TSPPのJおよびH会合体がなくなり、TSPPの単量体ピークだけが残った。以前は、PDDAに浸漬すると、PDDA層と静電的相互作用がないTSPP会合体が膜から脱離したと報告された。しかし、一層目のTSPP膜は、413 nmにTSPPのモノマー体ピークが観察されたが、膜数の増加と共に、413 nm付近のモノマー体吸収がなくなり、結果として過剰吸着によってTSPP分子間の π - π 構造を保ちながら、TSPP中心環の少なくとも四つ中の二つの空いているアニオン性吸着サイトを利用し、よくPDDA層と静電的相互作用を介し、多層膜の構築を可能にするTSPPのH会合体に変化した。水溶液中のTSPPは、膜形成前すでにH会合体を持っていることから、TSPPのH会合体のPDDA層の上において形成しやすくなったと考えられる。また、TSPP膜がPDDA水溶液(pH=5.7)に浸漬し、比較的に高いpH環境になると、TSPPの大員環中心プロトンが脱離し、J会合体のみならずH会合体間の静電的相互作用も効かなくなり、413 nm付近にあるTSPPのモノマー体に変化した。しかし、後続のTSPP(pH=4付近)の吸着によって、低いpHの環境下で元々あったTSPPのモノマー体と新たに溶液から供与されたTSPP分子と相互作用が強くなり、会合体を形成したと考えられる。

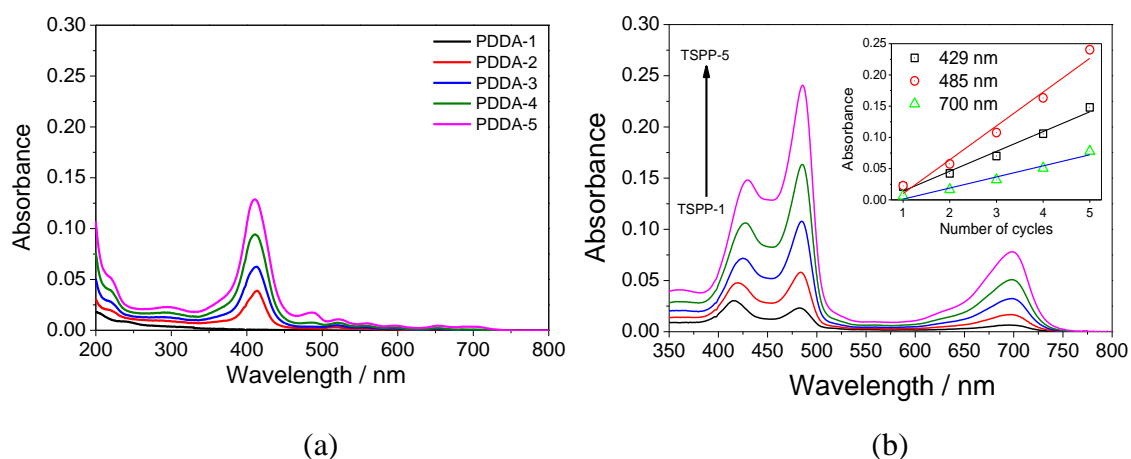


Figure 6.8. UV–vis absorption spectra of a PDDA/TSPP alternate film produced using five deposition cycles when the outermost layer was (a) PDDA and (b) TSPP. The insert in (b) shows the relationships between the absorbances at 429, 485, and 700 nm and the number of deposition cycles performed.

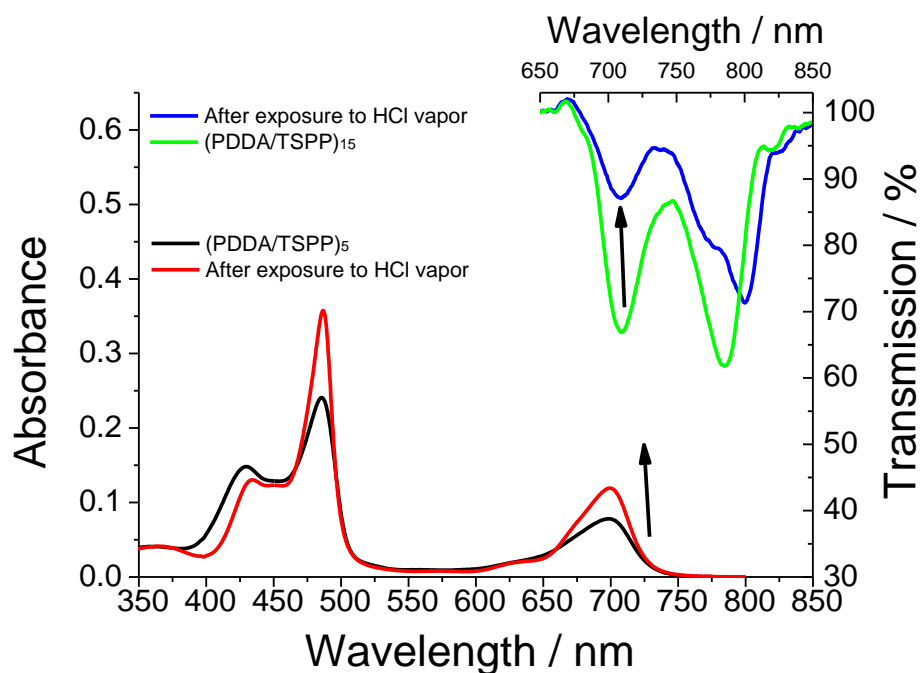


Figure 6.9. UV–vis absorption spectra of a PDDA/TSPP film deposited using five cycles before and after the film was exposed to HCl vapor produced by a 0.1 M HCl solution, and transmission spectra of a PDDA/TSPP film deposited using fifteen cycles before and after the film was exposed to HCl vapor produced by a 0.1 M HCl solution.

TSPPのJ会合体は、比較的に高いRIを持ち、酸性または塩基性ガスの暴露によって分子中心のプロトンの出入りが簡単に実現でき、ガス検知の高感度である。そのため、PDDA/TSPP多層膜中のJ会合体を増加させるためには、アンモニアガス暴露実験が行なわれる前に、LPG光ファイバーセンサーをHClガスに曝露した。薄膜にプロトンを与えることによって、TSPPのJ会合体の量が増加し、センサーの感度の向上につながる二つの共鳴バンドは、それぞれ、710と794 nmから709と804 nmへシフトされた。LPG光ファイバーは、増加するアンモニアガスの濃度に対して減衰バンドのシフトが0~50 ppmの濃度範囲内で直線的であった、**Figure 6.10**。直線範囲内のアンモニアに対する薄膜の感度は、0.7 nm/ppmであると推定された。検出限界(LOD)は、**Figure 6.10b**のデータから計算して0.67 ppmの($3\sigma = 0.47$ nm)であると推定された。スクロース溶液は、LPG 光ファイバーのRIに対する応答性を確認し、アンモニアガスの暴露に同程度のRIの推定を行なった、**Figure 6.10b**。アンモニアへの暴露前後の15層のPDDA/TSPP 薄膜のRI値は、それぞれ1.3585及び1.4643であると推定した。アンモニアへの曝露後のPDDA/TSPP薄膜の大きなRIの変化は、構造変化に起因することが最も高い可能性を示した。すなわち、TSPPは、J-会合体からモノマーに変形する時に、RIが1.4643より1.42の減少が報告されている[44]。その報告によると、水の上に単層としてTSPPのRIを測定したため、本研究の薄膜構造として使用されたTSPP会合体のRIの違いに起因する可能性がある。

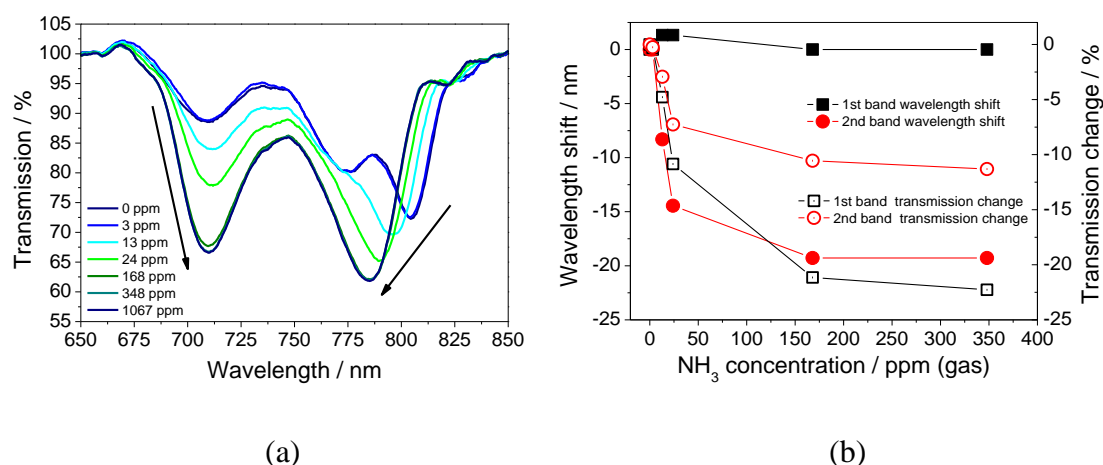


Figure 6.10. (a) Changes in the transmission spectra and (b) responses of the sensor when the LPG sensor coated with a PDDA/TSPP film produced using fifteen deposition cycles was exposed to ammonia gas, where 0 ppm means pure water vapor (containing no ammonia).

LPGは、6、9および15層のPDDA/TSPP膜で改質され、膜の厚さのセンサー性能への影響を調べた。異なる膜厚を有するLPGのTSに見られる変化を**Figure 6.11**示す。15層膜を有するセンサーは、他のセンサーよりも感度が高かった。最も敏感なセンサーが100 ppmのアンモニアに暴露されたときの二番目の共鳴バンドの波長のシフトは、約16 nmであると推定された。一番目の共鳴バンドの透過率の変化は、同様な傾向を示した。より厚い膜で被覆されたLPGのアンモニアに対する改善された感度は、アンモニアが結合される可能性のある部位の数がより厚い膜でより高くなることによって引き起こされた可能性がある。膜厚が厚くなると指数関数的に応答が増加した。

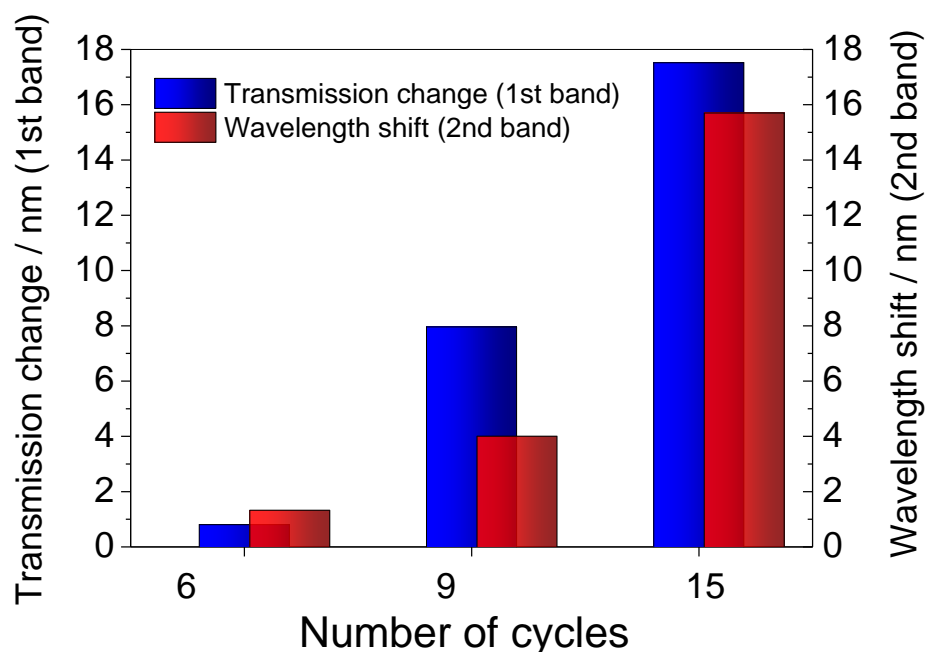


Figure 6.11. Comparison of the wavelength shifts after exposed to 100 ppm ammonia and the transmission changes obtained using the sensors with films produced using six, nine, and fifteen deposition cycles.

PDDA/TSPP 膜で修飾された LPG センサーがアンモニアを検出するメカニズムを **Figure 6.12** に示す。最初に、TSPP 分子は、主に PDDA 層上の J-凝集体の形態で吸着される。TSPP をアンモニアガスに暴露すると、TSPP が脱プロトン化され、単量体状態に戻る。これは、J 会合体をひずませて希釈し、膜の RI を減少させ、膜の TS を変化させる。PDDA/TSPP 膜が HCl 蒸気に曝されると、TSPP は、再びプロトン化され、J 凝集体が膜内で形成され、RI を増加させる。

Figure 6.12 の UV-vis スペクトルから明らかに示したように、TSPP は、HCl およびアンモニアの存在によって引き起こされるプロトン化および脱プロトン化反応によって、 $\text{H}_2\text{TSPP}^{2-}$ および TSPP^{4-} の間で変換することができる。膜をアンモニアおよび HCl に繰り返し曝露すると、 NH_4Cl が副生成物として生成される。必要に応じて水洗することにより NH_4Cl を容易に除去することができる。**Figure 6.12** から分かるように、8 より高い

pH 条件下で生成される単量体 TSPP^{4-} (遊離塩基形態) は、413 nm に強い Soret バンドを示し、pH 8 未満では、Soret が 435nm にレッド偏移し、単量体 $\text{H}_2\text{TSPP}^{2-}$ (二酸形) が形成される。450 nm 付近の吸収バンドが帰属される膜中の双性イオンポルフィリン $\text{H}_2\text{TSPP}^{2-}$ は、プロトン化されたピロール環とスルホン酸基との間の静電相互作用のために J 会合体を形成することができる。これが起こると、Soret バンドが 485 nm で生成され、Q バンドが 700 nm で生成される。アンモニア分子は、TSPP の J-凝集体からプロトンを受け取ることによってアンモニウムイオンに変換される。これにより、2 つの J 凝集吸収バンドが完全に消失し、膜は、410 nm 付近で遊離塩基モノマー (TSPP^{4-}) の吸収バンドのみを生じる。

PDDA/TSPP 膜の選択性を確認するために、我々は、空気中で飽和していた揮発性有機化合物または揮発性有機アミンのようないくつかの潜在的妨害ガスに石英プレート上に堆積し、HCl 蒸気処理した 10 サイクル膜を暴露した後の UV-vis 測定を行った。クロロホルム、アセトン、メタノール、エタノール、酢酸、ベンゼン、トルエンなどの有機揮発性物質の UV-vis スペクトルには、明確な変化は観察されなかった。2 つの Soret バンドおよび Q バンドの顕著な光学的変化は、トリメチルアミン、トリメチルアミンおよびピリジンのような有機アミン蒸気に暴露によって引き起こされた。PDDA/TSPP 膜が、アンモニアおよび揮発性有機アミンの両方に対して十分な交差感度を示すことを意味する。しかし、アンモニアに対するその感受性は、使用される揮発性有機アミンよりはるかに良好である。

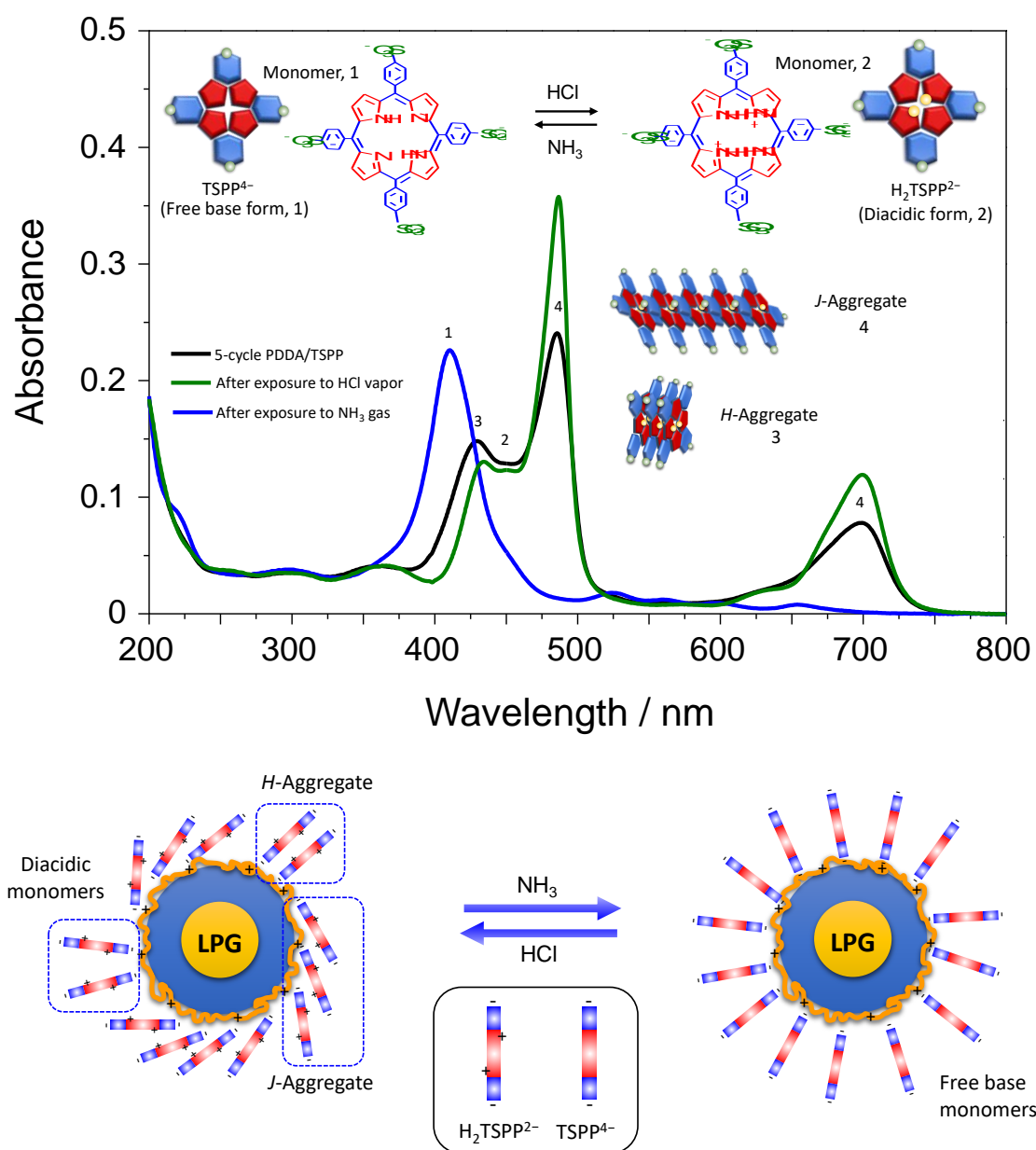


Figure 6.12. (a) Evolution of the UV–vis absorption spectrum of a PDDA/TSPP film produced using five deposition cycles on a quartz plate. The black line is for the as-prepared film, the green line for the film after it had been exposed to HCl vapor produced by a 1.0 M HCl solution, and the blue line is for the film after it had been exposed to ca. 500 ppm ammonia gas. (b) Schematic of the mechanism through which the PDDA/TSPP film deposited on an LPG fiber senses ammonia.

6.3.2 高分子電解質薄膜の屈折率変化に基づいたアンモニアガス検知

高分子電解質は、高分子が水またイオン化溶媒に溶解すると高度な電解性高分子になる。このような高分子の解離は、通常、分子の保持する電化が中和になる傾向があるため、より小さい反対に帯電した対イオンを伴っている[45]。高分子電解質は、低いイオン強度の水溶液中に存在する時に拡張されたと巻かれていない部分が分子内の各モノマー単位にシールドの電荷の分子内反発力のために形成する傾向がある。また、水溶液のイオン強度が増加するにつれ、溶液中での小さな塩の対イオンの過度の存在によって、ポリマーの電荷の遮蔽効果のために厚く、より多くのコイル状になる。高分子電解質の選別は、チューニングの厚み[46]、均一性[47]、安定性[48]、膨張[49]、透過性などの重要な要因となる。また、他の重要な特性は、自然状態の高分子電解質と Layer-by-Layer 長薄膜のコンポジットまたはアセンブリによって変更される[50,51]。

高分子電解質は、豊富なプラスまたマイナス電荷を有することから、有力的なLbL法を介して高分子電解質の多層超薄膜が簡単に得られる。LbL法による高分子電解質の多層薄膜は、再現性の吸着が不可逆的なフィルムが安定であり、表面被覆率が良好である。薄膜形成は、簡単、安価、堅牢、清潔で、多彩などの特徴を有する[52]。高分子電解質は、特定の化学種であり、水とイオンを保持するため容易に二次関数を組み込むことができる[52,53]。

弱高分子電解質は、解離程度が強くpHに依存するなどの豊富な特性を有するため、多層薄膜の作成材料として研究されてきた。PAH/PAAの多層膜は、吸収液のpHに敏感に依存する。特定のpHおよびイオン強度の条件下で形成されたPAH/PAA多層膜は、ポスト準備時に低いpHの水また塩を含んでいない水に浸漬させると、マイクロおよびナノポーラス膜を形成する形態学的に変化することができる。また、弱PE多層膜がアクセス可能な反応部位を用いて調製できることが示されている[54]。

高分子電解質多層膜は、基板上に反対に帯電した高分子電解質の規則的に静電吸着することにより調製することができる。様々な組織化のパラメーターの制御によって、多層薄膜の厚み、内部構造、および表面粗さにわたって良好なコントロールを得ることができる[54]。Layer-by-Layer (LbL)吸着法により、作製した高分子電解質多層薄膜は、すでに広範囲にわたって研究されており、センサー[56-58]、薄膜[59]、薬物伝送剤[60-62]としての潜在的な応用が実証された。完全に pH の広い範囲で充電されたまま強い高分子電解質とは異なり、弱いシステムの電荷の割合は、自己組織化の pH を調整することができる。カチオン性ポリマーの Poly(allylamine hydrochloride) (PAH)、poly(diallyl dimethyl ammonium chloride) (PDMA)およびアニオン性ポリマーの Poly(acrylic acid) (PAA)は、多くの特異な性質を示すことができることから、最も研究されている高分子電解質である。PAA ポリアクリル酸は、アニオン性高分子電解質であり、PAA のカルボキシル基と NH_3 との強い化学結合の相互作用で簡単に高分子電解質の多層薄膜を得られる。

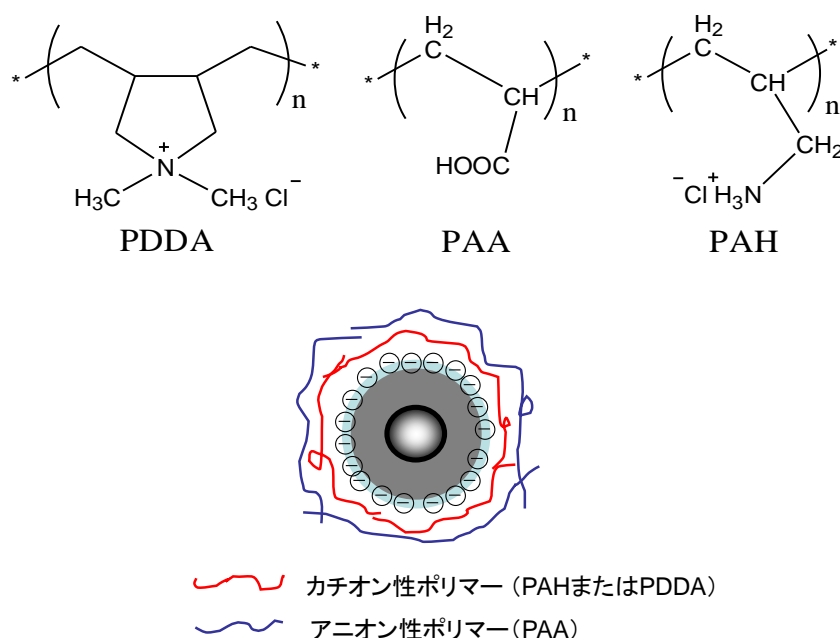


Figure 6.13. Chemical structures of the compounds used for film preparation and schematic illustration of an LPG fiber.

PAH/PAA または PDDA/PAA 膜の堆積中、LPG の TS は劇的な変化を受ける。**Figure 6.14a,b** にそれぞれ示されるように、2 つの代表的な共鳴バンドは両方の場合において反対方向にシフトする。堆積サイクル当たりの平均波長シフトは、PDDA/PAA 膜については第 1 および第 2 の共鳴バンドについてそれぞれ 3.4 および 5.5 nm であり、PAH/PAA 膜についてはそれぞれ 8.9 および 13nm であると推定される。最外層が PAA である場合、TS の変化はより顕著であり、膜の OT が吸着された PAA の量に依存することを示している。堆積サイクルの増加に伴う線形波長シフトは、膜が均一に堆積されることを実証する。

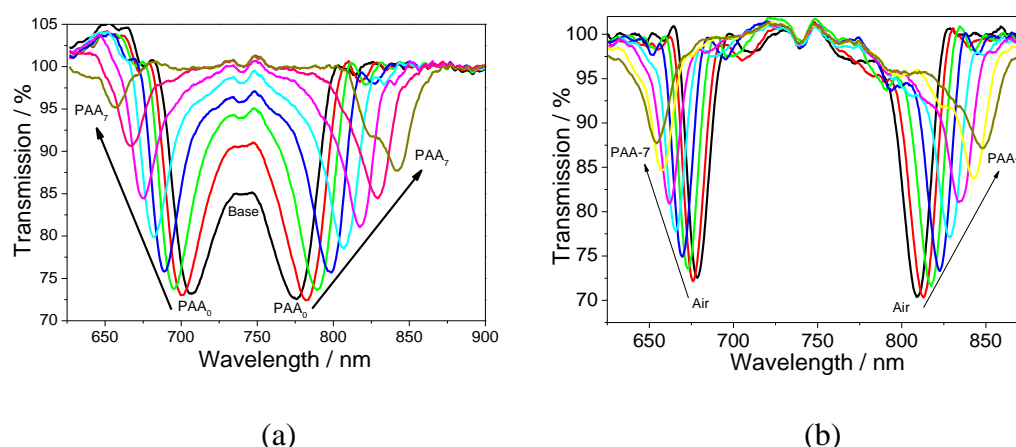


Figure 6.14. TS changes of the LPG optical fibre after deposition of PAA: (a) PAH/PAA and (b) PDDA/PAA films, respectively.

コーティングされた LPG 繊維をアンモニア濃度の増加にさらすと、第 2 の共鳴バンドの直線的な波長シフトが両方の場合で観察された (**Figure 6.15**)。 **Figure 6.15** のデータから計算された検出限界 (LOD) は、それぞれ 7 サイクルの PAH/PAA および PDDA/PAA 膜について 10.7 ppm および 2.3 ppm ($3\sigma=0.47\text{nm}$) であると推定された。 センサー応答は、PAA 溶液を用いて LPG センサーを約 3 分間洗浄した後に再生す

ることができた。5分。興味深いことに、両方の LPG センサーは、トリメチルアミン (TEA)、トリメチルアミン (TMA)、エタノール、およびメタノールなどの他のアミンおよび非アミン化合物 (飽和ガスとして) と比較してアンモニアに対する優れた感度を示した。LPG センサーを飽和非アミン化合物に暴露した場合、測定可能な変化は観察されず、飽和 TEA および TMA ガスは、100 ppm のアンモニアガスへの暴露に反応して測定されたものよりも比較的小さな波長シフトを示した。アンモニアの優れた結合性は、他のアルキルまたは芳香族アミン化合物よりもはるかに優れた膜溶解性に帰することができる。膜の RI の増加は、二重層の静電相互作用の変化による薄膜の密度の増加を示唆している。

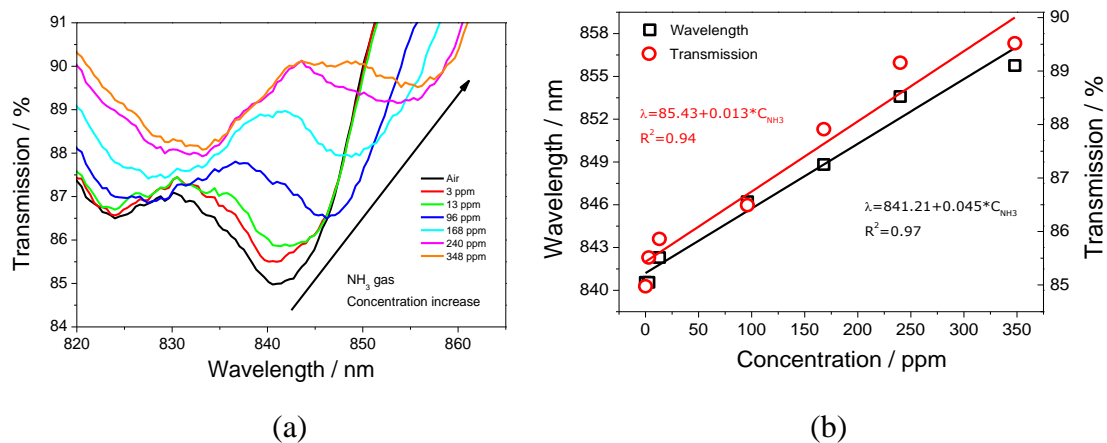


Figure 6.15. (a) TS changes of the LPG fibre modified with a 7-cycle PAH/PAA film at the exposure to different concentrations of ammonia gas and (b) dependence of wavelength shifts and TS changes of the 2nd resonance band upon the ammonia gas concentration.

Figure 6.16 は、すべての場合でシミュレーション結果と一致している Si ウエハ上に調製 PAH/PAA 膜 (データは示していない) の反射スペクトルを示す。7 サイクル PAH/PAA 膜の厚さは約 10 μm であると推定された。Si 基板上のその反射スペクトル

から 180 nm の厚さを示し、堆積された各二重層は約 10 nm の厚さを示す。25±3 nm。得られた RI 値および厚さ値は、アンモニア結合のために PAH/PAA フィルムの OT の変化を計算するためにも使用することができる。1000 ppm のアンモニアガスに暴露した後、**Figure 6.16e** に示すように、干渉極大における 116 nm の波長シフトが観察された。この波長シフトは、PAH/PAA 膜の OT では 58 nm であった。

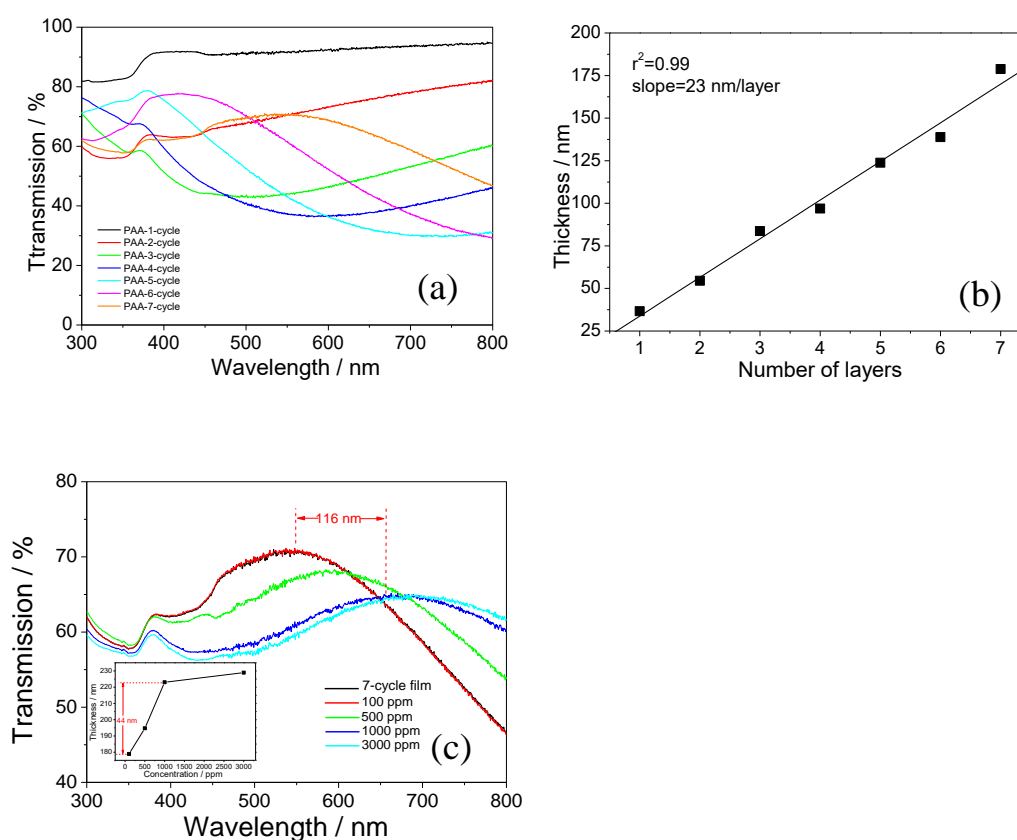


Figure 6.16. (a) Reflection spectra of the films with different PAA deposition layers and (b) film thicknesses calculated from the reflection spectra. (c) Reflection spectra of the 7-cycle PAH/PAA film after exposure to different concentrations of ammonia gas and (d) the corresponding OT changes.

アンモニアガス吸着により誘起される OT の変化を明らかにするために、アンモニアガス暴露前後のセンサー膜の形態変化を調べた。**Figure 6.17** は、アンモニアガス(約

3000 ppm)に暴露する前後に記録された PDDA/PAA 7 層膜および PAH/PAA 7 層膜の表面形態の AFM 画像を示す。PDDA/PAA 膜および PAH/PAA の 7 層膜の表面平均粗さは、21.1 nm から 18.3 nm へのアンモニアガスおよび 32.1 nm から 17.1 nm への暴露後に減少する。通常、AFM は、幅ではなく表面上の高さに関するより正確な情報を提供する。この目的のために、2 種類の最も薄い PAH/PAA 交互膜、PAH/PAA および PAH/PAA/PAH を Si 基板上に調製し、外科用ナイフを用いて傷つけた。製造された膜としての二つの膜の厚さは、基材の引っ掻き底から測定した高さの平均から推定した。データの信頼性については、各膜上の 9 点を選択した(データは示していない)。このアプローチを使用して、上記膜は、アンモニアに暴露する前に、それぞれ 36.2 ± 7.1 および 42.0 ± 6.3 nm の平均厚さを有することが見出された。したがって、個々の PAH および PAA 層の厚さを約 6 nm、30 nm と予測することができる。一方、アンモニアガス暴露後、PAH/PAA 膜では 36.2 ± 7.1 nm から 43.2 ± 11 nm に、また、PAH/PAA 膜では 42.0 ± 6.3 nm から 22.8 ± 6.7 nm に膜厚みが増加した。

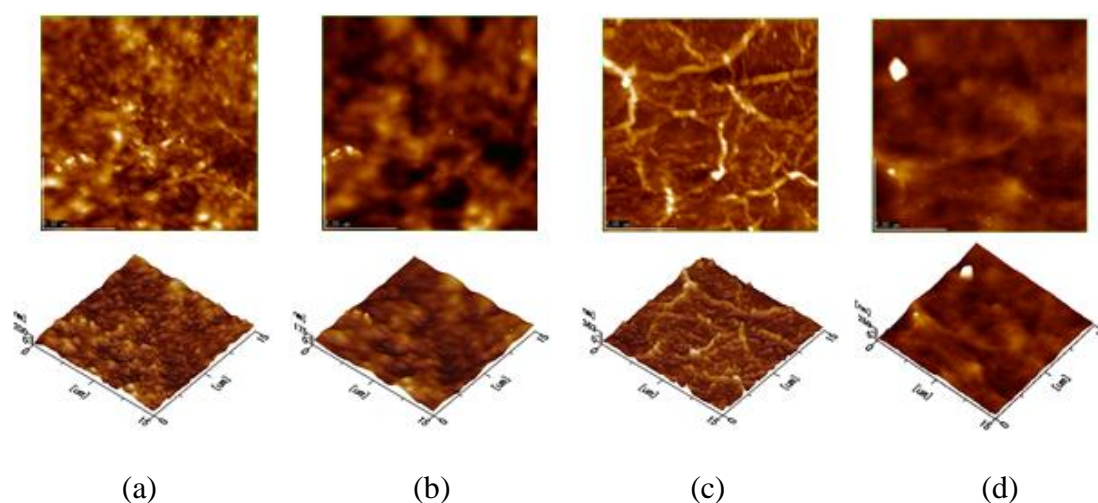


Figure 6.17. AFM images of the surface morphology of the 7-cycle (a and b) PDDA/PAA and (c and d) PAH/PAA films before (a and c) and after (b and d) exposure to ammonia gas (3000 ppm), respectively.

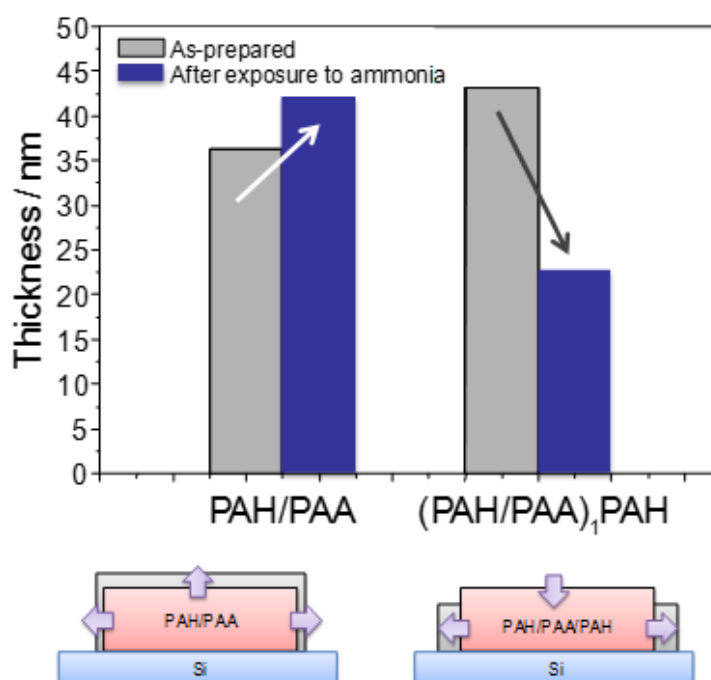


Figure 6.18. (a) Thickness changes of the PAH/PAA and (PAH/PAA)₁PAH films after exposure to ammonia gas (3000 ppm). Schematic illustration explains the mechanism of the morphological changes of both films.

PAH/PAA/PAH 膜の厚さの減少は、膜密度の増加に関する当業者の仮説を立証するものである。反射率および AFM 結果に基づいて、PAA 固定 LbL 膜の収縮はアミン分析物の吸着によって誘導され、OT 増加 (膜密度の増加) の重要な要因となると結論付けることができる。我々は、厚さを決定するために使用される AFM 法は、我々の膜厚計算の有効性を検証する効果的かつエレガントな手段であると考えている。

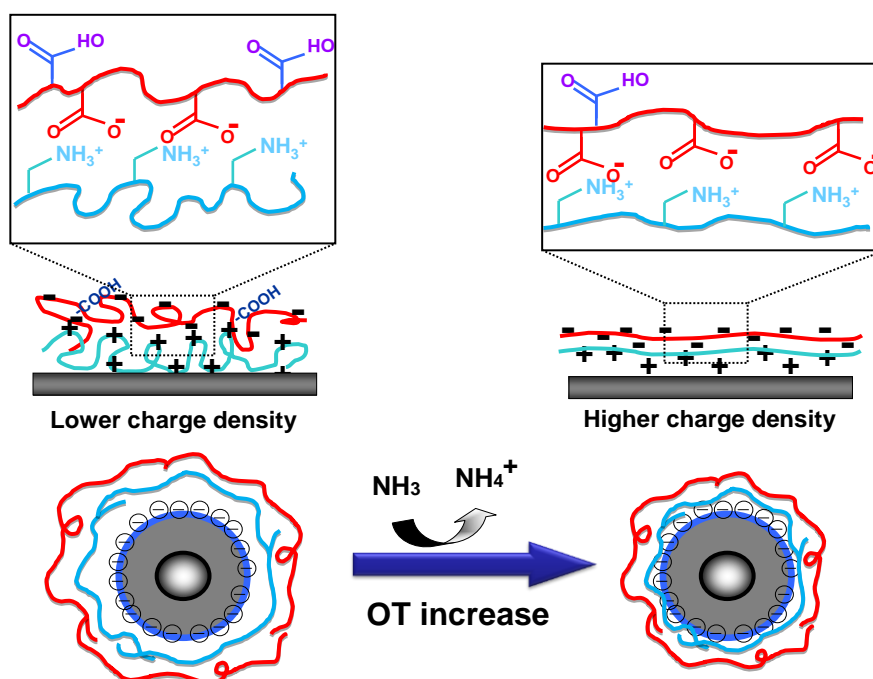


Figure 6.19. Schematic illustration of the morphology change in the PAH/PAA film after exposure to ammonia gas.

6.3.3 分子インプリント法に基づいたLPG光ファイバーセンサーの選択性向上

生体では、多様な化学反応が高効率で緻密に制御され、それによってあらゆる生体機能が生まれている。それらの生体機能の中で最も基本的なのが、極めて高度な分子認識機能である。分子インプリント(MI)は、高い選択性、繊細な分子認識能力を有する技術であり、1949年にDickeyらによって初めて報告された[63]。無機系MI技術は、生体高分子に比べ簡単かつ安価に生産でき、物理的・化学的安定性も高く、複雑な有機物との適合性及び柔軟かつ安定な構造などの利点を有するため、各種センサー素子、吸着材、レセプター機能を持つ生体模倣膜などへ応用できる。分子インプリント薄膜の作成法として、ゾルゲル[64]、気相表面ゾルゲル[65]、液相堆積法[66] 及

びスピニングコーティング[67]などが報告されている。分子インプリンティングするために、シリカゲルおよび有機ポリマーは、一般的な材料として働き、これらの材料に結合する架橋剤を介してテンプレートができるとして使用される。一方、Leeらは、表面ゾルゲル法を利用して酸化チタンと有機物からなる有機無機ハイブリッド薄膜を作製して分子インプリントナノ薄膜として機能することを初めて報告した[68]。金属酸化物材料の分子インプリント膜は、複雑な有機分子への適合性、柔軟な膜構造などの利点を有する。しかしながら、このようゾル-ゲル法などの従来の有機溶媒プロセスにおいて、堆積種が溶液内の任意の場所に形成されるため、反応プロセスを制御することは困難である[69]。液相堆積法(LPD)は、金属酸化物の水溶液から膜を作製することがよく知られている。LPD法は、水溶液中における金属フルオロ錯体の加水分解平衡反応を利用した酸化

物薄膜を水溶液から基板上に直接合成する方法であり、反応の概要は以下の反応式で表すことができる[70]。LPDのプロセスは、高エネルギーを必要としないことから、金属酸化物は有機テンプレートを使用するのに適している。酸化チタン(TiO_2)/無機ハイブリッド薄膜は、LPD堆積プロセスによるタンパク質認識、L-グルタミン酸インプリンティングとして報告されている[71,72]。他の膜技術と比較して、LPD技術は低温、低コストで信頼性の高い方法であり、それは、下部(水性前駆体に基づいて)資本設備コスト、エネルギー効率、および高い柔軟性を提供する。LPDによって調製薄膜の密度は、蒸着、ゾル-ゲル法などの他の方法により調製された膜よりも高い。さらに、酸化チタン、それはまた、光触媒として機能することができ、機能材料として注目を集めた。また、これまでの分子インプリント実験では、テンプレート分子の吸着を確認するために、主に使用されるセンサーデバイスは、水晶振動マイクロバランス(QCM)であり、デバイスが高価で外部条件(湿度、温度)に影響されやすい弱点がある。また、石英基板上に分子インプリント膜を作製して光吸収を持っているテンプレートの吸着による光吸収の

変化を観察するのが一般的な手法である。本研究では、液相堆積法(LPD)を利用し、TiO₂材料とポルフィリン分子のtetrakis-(N-methyl-pyridinium-4-yl) (TMPyP)の有機無機ハイブリッドMIナノ薄膜を長周期格子光ファイバー(LPG)に応用し新規高選択性の化学センサーの開発を試みた。屈折率(RI)の摂動に対するLPGの高感度は、光ファイバーセンサーとしての広範な研究に繋がる。テンプレート分子の除去及び再結合に伴う薄膜のRIの動的变化に基づき、センサーは、有機芳香族カルボン酸(ACAs)と比べ、テンプレート分子であるカチオン性のTMPyPに対し高い選択性を示唆された。LPD法は、従来のゾルゲル法と比べ、製膜時に有機物に損傷を与えることがなく、低い必要なエネルギー、柔軟かつ高密度な薄膜構造などの利点を持つ。本研究成果は、光ファイバーに基づいた光学検知技術の可能性だけではなく、センサー素子に向けた無機金属MI 薄膜の新たな可能性を示唆している。

長さ30 mm、周期97 μm のLPGは、周波数4倍のYAGレーザーを用いた光シングルモード光ファイバ(PS750、Fibrecore)で、point-by-point方式で作製された。(NH₄)₂TiF₆(100 mM)、H₃BO₃(500 mM)およびTMPyP(1.0 mM)水溶液を含むLPD反応溶液 [(NH₄)₂TiF₆:H₃BO₃:TMPyP = 4.5:4.5:1, v/v] に LPG を浸漬した。堆積後、TMPyP/TiO₂膜改質LPGを60°Cのオーブン(湿度90%)で12時間保持した。100 mM (NH₄)₂TiF₆水溶液と500mM H₃BO₃水溶液とを1:1の割合で混合することによって非インプリントのTiO₂膜形成溶液を調製した。TMPyP/TiO₂膜も、LPGセンサーの作製に用いたのと同じ方法で石英基板上に堆積させた。TMPyP/TiO₂膜を0.01 MのHClに15分間浸漬してTMPyPテンプレートを除去した。さらに、TMPyPインプリント膜(以下、MI膜と称する)をアンモニア水溶液(5wt%)で5分間処理して、テンプレートの再結合前に膜の負電荷を陰性にした(Figure 6.21)。

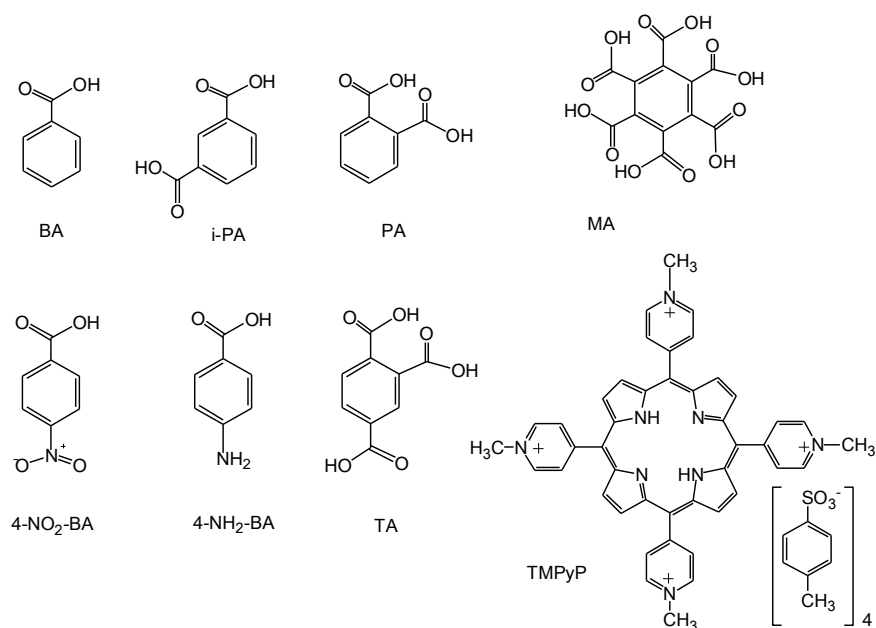


Figure 6.20. Chemical structures and abbreviations of the compounds used for molecular imprinting and photodegradation experiments.

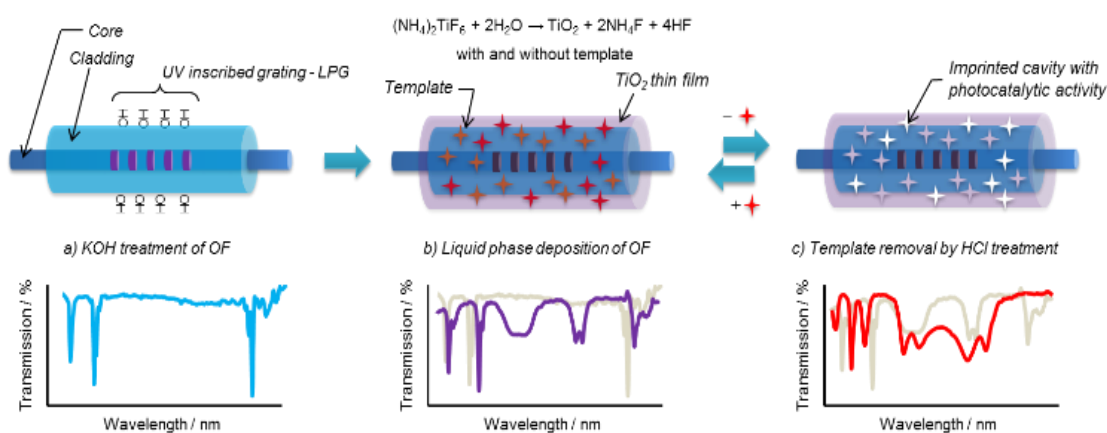


Figure 6.21. Schematic illustration of the process of modifying the surface of the optical fiber LPG with a molecularly imprinted film.

3つのLPG共鳴帯 692、775および888 nmが4.5時間堆積後に新たに観察される。LPD膜堆積中、位相整合点における共振帯域が形成されるので、透過率は775 nmで減少する。約775 nmのバンドは、4.5時間の成膜後、約692 nm(第1バンド)および888

nm (第2バンド) の2つのバンドに分割される。さらに、熱処理後、約690 nmでの第1の共鳴バンドの青色シフトおよび約905 nmでの第2の共鳴バンドの赤色シフトが観察される。このことは、熱処理の際にTiO₂被覆の結晶化度が増加することを示唆している。その結果、TMPyP/TiO₂膜のRIが向上する。

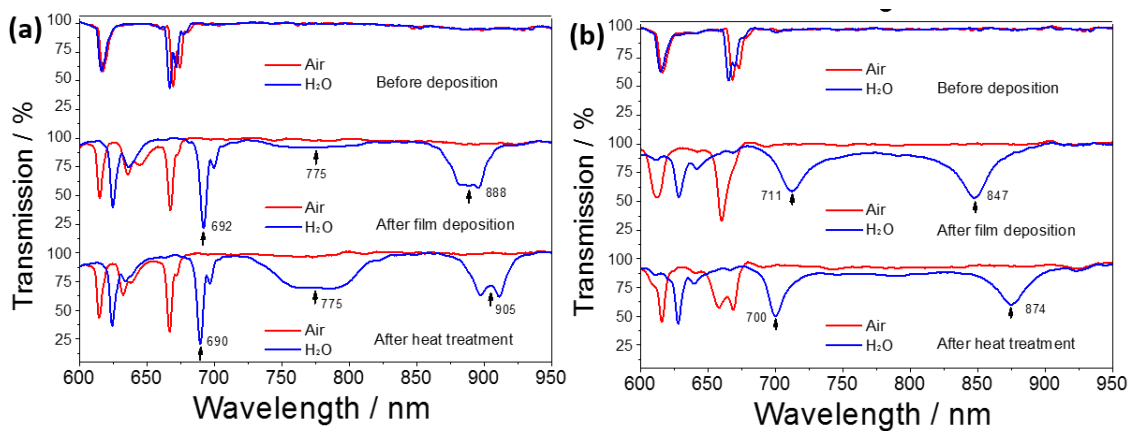


Figure 6.22. TS of the LPG optical fiber upon deposition of the (a) TMPyP/TiO₂ film and (b) NI-film for 4.5 h, and after heat-treatment at 60 °C (humidity 90 %) for 12 h, measured in water and air.

Figure 6.22 は、60°Cで 12 時間の熱処理前後の TMPyP/TiO₂ 膜と NI 膜の表面形態を比較している。対照的に、TMPyP/TiO₂ 膜は均一なナノサイズの粒子 (約 5~10 nm) から形成される (**Figure 6.22c**)。両方の膜について 60°Cでの熱処理後に構造変化は見られない (2b および d)。**Figure 6.22b** および d は、シリコン基板上に形成された NI 膜および TMPyP/TiO₂ 膜の画像を示す。TMPyP/TiO₂ 膜は、TMPyP/TiO₂ 膜上に堆積された TiO₂ 粒子がより小さいので、NI-膜に比べて非常に透明である。

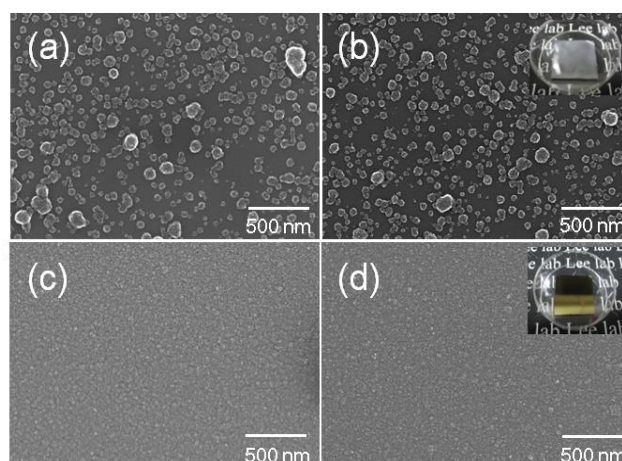
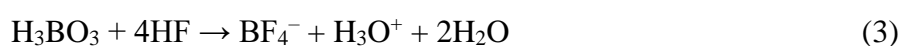
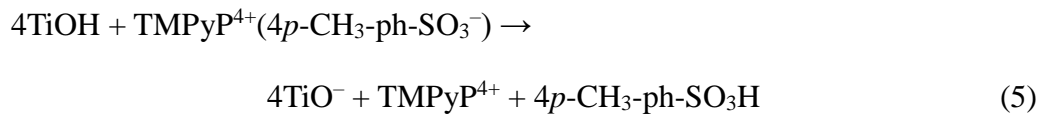


Figure 6.23. Comparison of the SEM images of the films deposited on silicon wafers. (a) NI-film after 4.5 h deposition and (b) after 12 h heat treatment at 60 °C. (c) TMPyP/TiO₂ film after 4.5 h deposition and (d) after 12 h heat treatment at 60 °C; The insets in (b) and (d) show photographs of the NI-film and TMPyP/TiO₂ film prepared on the silicon substrate, respectively.

LPD に基づく TiO₂ 膜は、式(1)の反応に従って光ファイバーの表面上に堆積させることができる。(2)および(3)を満たす。TiO₂ の表面は、水溶液中で容易にヒドロキシル化され、2つの特有のヒドロキシル基を形成する(式(4))。TMPyP の p-トルエンスルホン酸(p-CH₃-ph-SO³⁻)対アニオンとの TiO₂ 表面上のヒドロキシル基のイオン交換反応(式(5))を介して、TMPyP が TiO₂ マトリックスに組み込まれる可能性がある。周囲の水溶液の pH は TiO₂ の表面状態に影響を及ぼし、表面電荷はある pH でバランスする。調製したままの TMPyP/TiO₂ 膜の表面電荷は、式中の酸塩基平衡に従って制御することができる。(pH) (HCl 処理)およびより高い pH(アンモニア処理)にそれぞれ対応する(6)および(7)膜の HCl 処理は、TMPyP と TiO₂ マトリックスとの間の静電相互作用を弱くする。その結果、TMPyP 分子を膜から除去することができる。





更に、センサーのTMPyP溶液(0~100 μM)の浸漬実験を行い、LPGの減衰バンドの挙動を観察した。本研究のLPGセンサーの特徴としては、修飾膜の屈折率の増加と共に、初めに1stと2ndの減衰バンドがそれぞれ、730 nm及び930 nm付近まで逆方向にシフトして、次に775 nm付近の3rdの減衰バンドが形成され、その透過率が増加する。つまり、本研究のLPGセンサーの減衰バンドを確認するために、二段階のピークの変化を確認する必要がある。一方、上記の異なる濃度のスクロース溶液で浸漬する結果と比べ、スクロース溶液の浸漬は、単なる1stと2ndの減衰バンドの波長の変化だけで、3rdの減衰バンドの変化が見られなかった。**Figure 6.24**に示したように、低濃度の1 μM を浸漬することによって、LPGの透過スペクトルから明らかな減衰バンドのシフトが確認できた。センサーのTMPyP 溶液(0~100 μM)の浸漬実験結果を**Figure 6.24c**にまとめた。そして、TMPyPの浸漬の後に、LPG表面を水の洗浄、窒素で乾燥を行なった後にLPGの減衰バンドを確認すると、濃度に応じて減衰バンドのシフトが確認できた。つまり、TMPyP分子は、酸化チタン膜と結合していることがわかった。

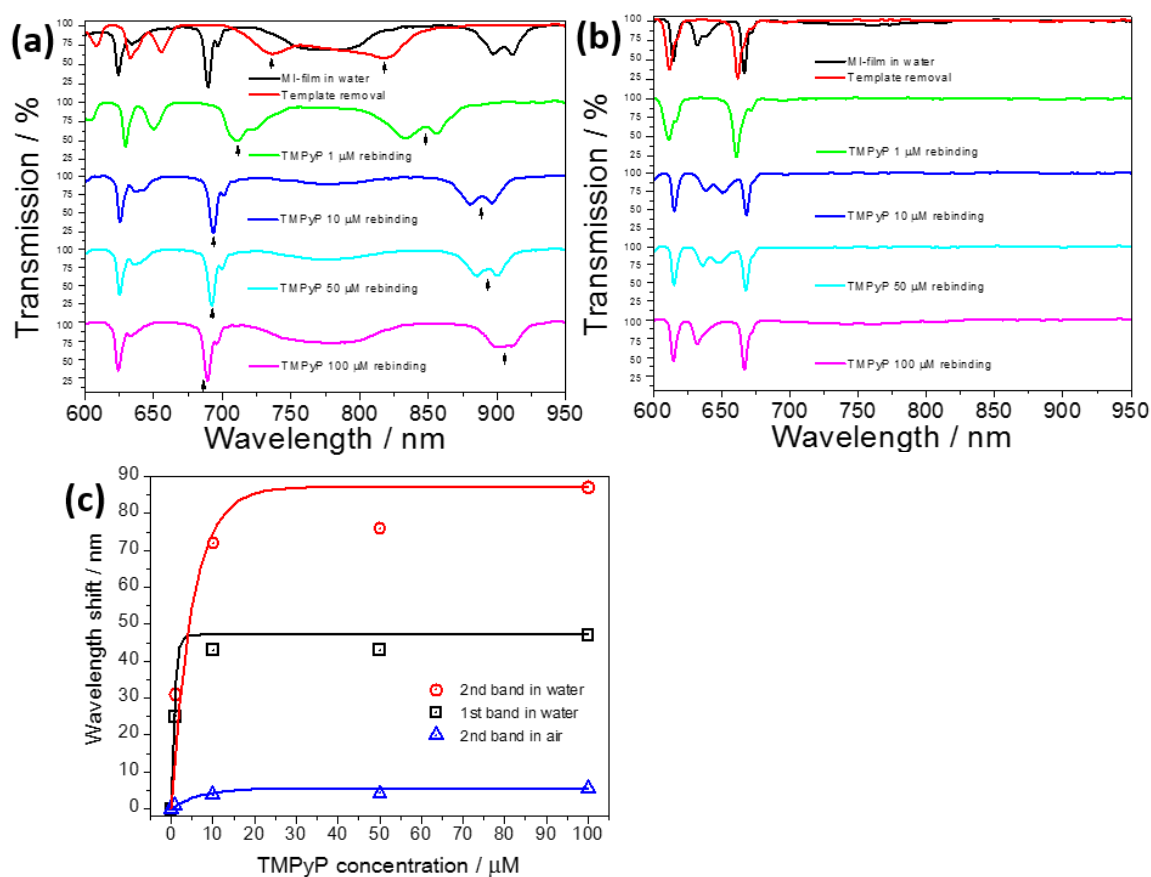


Figure 6.24. TS of the MI-film-modified LPG upon re-binding with different concentrations of TMPyP in (a) water and (b) air. (c) Calibration curves plotted from wavelength shifts of the 1st and 2nd resonance bands in water, and the 2nd resonance band in air.

Figure 6.25 は、MI および NI 膜のテンプレートおよびゲスト分子への暴露時の第 1 および第 2 の共鳴バンドの波長シフトを比較する。NI 膜は、2~7 nm の波長シフト範囲において試験された化合物の全てに対して小さな応答を示す。興味深いことに、MI 膜および NI 膜の両方における MA および TA は、鋳型と比較して比較的大きな結合を示す。この反応は、分子内に 6 個と 3 個のカルボキシル基を有するため、MA と TA の場合の分子間水素結合に起因すると考えられる。これらの中で、いくつかのカルボ

ン酸は、水分子がフィルムから除外される分子内水素結合を形成するために使用される。

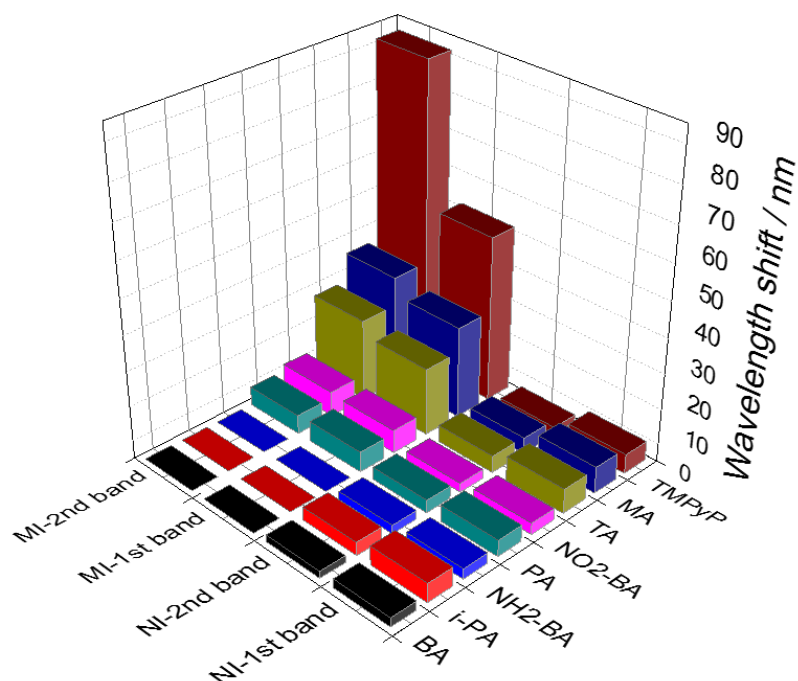


Figure 6.25. Comparison of the wavelength shifts upon exposure to the template and guest molecules for the MI- and NI-films.

Figure 6.26b は、UV 光 ($\lambda = 352\text{nm}$) の照射による色素濃度の減少を示す。熱処理なしの MI 膜と比較して、熱処理された MI 膜の両方は、テンプレート照射のための光触媒活性の実質的な増強を示す。TMPyP は 60°C 、 90°C で 300 分間 UV 照射した後、完全に分解する。これらの結果から、熱処理で作製した MI 膜は結晶性が良好であり、分子インプリンティングと熱処理の相乗効果により MI 膜の光触媒活性が促進されることが明らかとなった。

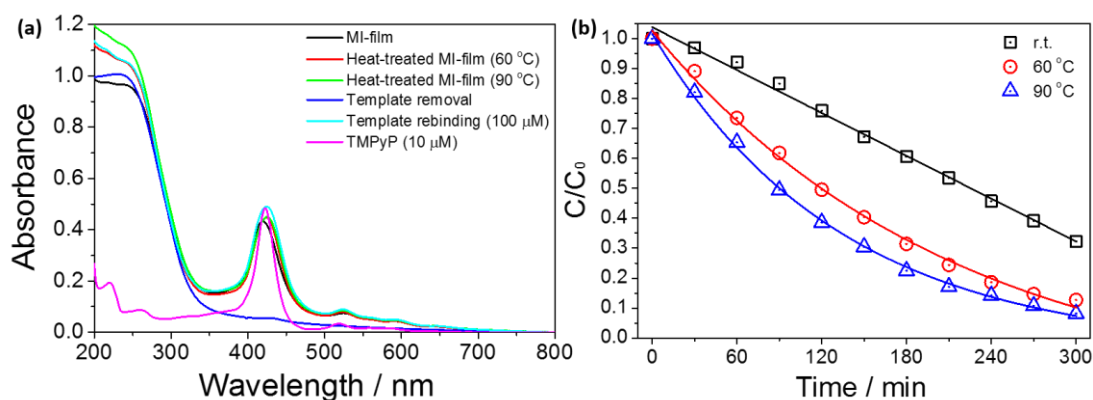


Figure 6.26. (a) UV–vis absorption spectra of the MI-film before and after heat treatment at 60 and 90 °C and upon TMPyP removal and rebinding in a 100 μM solution. The pink line shows the UV–vis spectrum of a TMPyP solution (10 μM). (b) The photodegradation of TMPyP on the MI-films, which are prepared without heat treatment (black line), with heat treatment at 60 °C (red line), and with heat treatment at 90 °C (blue line), under UV irradiation assessed from the absorbance at 422 nm.

第 1 および第 2 の共鳴バンドは、UV 照射下では 46 および 85nm、屋内可視光下では 47 および 89nm の反対方向にシフトを示した (**Figure 6.27a**)。 **Figure 6.27b** は、800nm で測定した MI 膜改質 LPG センサーの動的強度変化を比較している。TMPyP の吸着速度は、UV 照射下の最初の 10 分間で、屋内可視光よりも速い。興味深いことに、UV 照射下での TMPyP の光分解は、その飽和吸着後に起こる。UV 照射下での TMPyP の吸着の増加は、2 つの要因を考慮することによって説明することができる: 第一に、UV 照射による結合部位の負電荷密度の増加、および鑄型分子と活性化された TiO₂ マトリックスとの間の静電的相互作用の増強。第二に、MI 膜への物理的吸着によって付着する不純物の分解。おそらく、これらの要因は、鑄型の再結合および光分解

のためのさらなる活性部位を提供する。

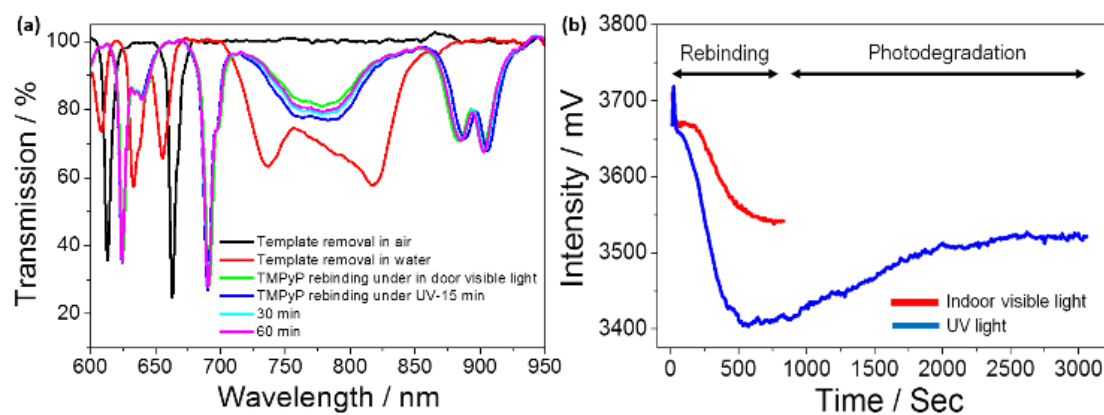


Figure 6.27. TS of the MI-film-modified LPG sensor prepared to explore its photocatalytic activity and (b) dynamic intensity changes of the MI-film-modified LPG sensor due to TMPyP rebinding measured at 800 nm under indoor visible light and under UV irradiation.

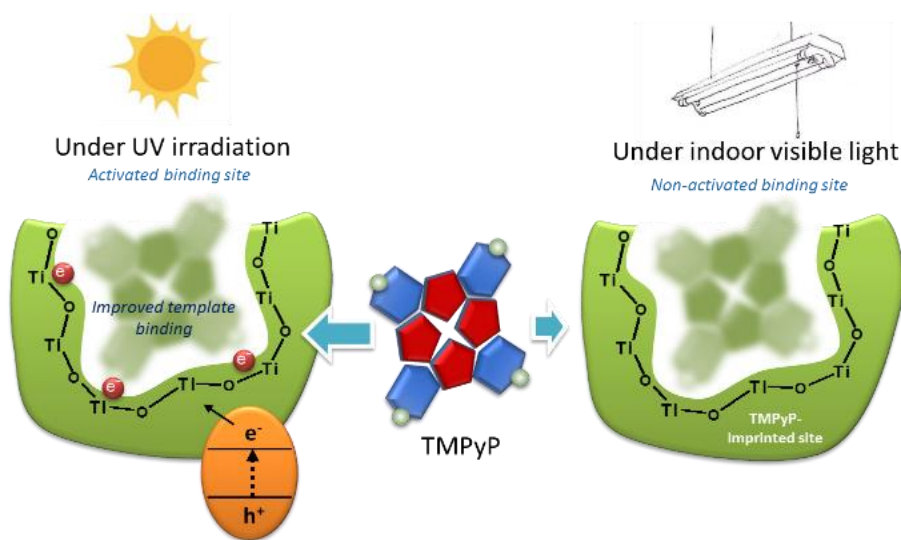


Figure 6.28. Schematic diagram of photocatalytic function of titanium oxide thin film.

6.3.4 金ナノ粒子によるヒトポリアミン検知

金は、古くから化学的安定性より装飾品や貨幣などに用いられ、近年ではそのユニークな化学的および物理的な性質に基づいた実用的な応用に関心が高まっている。例えば、金ナノ粒子(AuNPs)の場合、その良好な導電性によってナノ粒子内の自由電子が集団的に振動し、共鳴波長の光のエネルギーを吸収する。その特性を生かして特有の波長において電子の動きが最大となる共鳴が起きる。これを表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)と呼ぶ[73]。

AuNPs(5～200 nm)は、一般的に粒子のサイズに応じて 520～540 nm の波長にある緑色光を吸収するため、その水溶液は赤または赤紫色を呈する。一方、粒子表面状態の化学的変化により凝集が生じると、長波長領域散乱光が増大することで可視吸収スペクトルが変化し、その色が青また紫へと変化する。AuNPs 水溶液の変色は、肉眼でも観察できるため、AuNPs の特殊比色測定機能を利用し、アミノ酸[74]、ペプチド[75]、メラミン[76]およびアミノ酸の誘導体[77]など、生命に深く関わる有機化合物の選択的かつ高感度な検知が可能となる。その他に重金属分析[78,79]、トリニトロトルエン(TNT)のような爆薬の検知[80,81]など、幅広く応用されている。SPR 特性以外に AuNPs は、高い吸光係数、大きい表面積、容易な表面改質などの特徴を有する。様々な AuNPs の合成法が今でも検討されてきたが、1951 年に Turkevitch によるテトラクロロ金(III)酸四水和物のクエン酸還元法が広く利用されている[82]。また、1973 年に Frens は、クエン酸三ナトリウムと塩化金の比率を変えることで AuNPs のサイズ(16～147 nm)を制御できると報告した[83]。クエン酸還元剤を用いた AuNPs の調製は、粒子表面がいずれもカルボキシル基によって保護されたアニオン性表面をもち、その表面特性や安定性を利用して様々な化学分野で利用されている[84]。

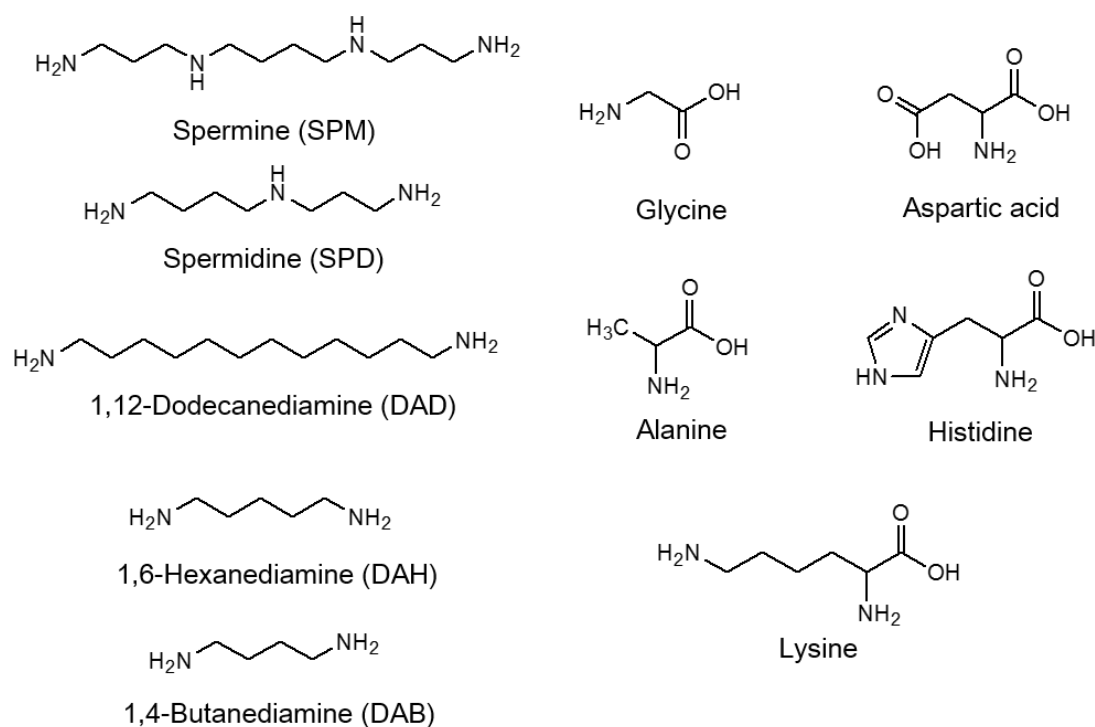


Figure 6.29. Structures of the chemicals used in this study.

ポリアミンは、人体内に約 20 種類が存在し、スペルミン、スペルミジン、プトレスシンの 3 種類が代表的な例として知られている。本研究では、細胞の新陳代謝に深く関係するスペルミンと酵素の活性化に作用するスペルミジンの 2 種類のポリアミンを検知対象とした。**Figure 6.30a** に c-AuNPs 溶液にスペルミン水溶液を混合した後の UV-vis スペクトルを示した。スペルミンの濃度増加(0, 0.5, 1, 3, 5, 50 μM)につれて、520 nm の c-AuNPs の吸光度が減少した。これは、混合溶液中の c-AuNPs 濃度がスペルミンの添加によって減少したためである。しかし、3 μM のスペルミン水溶液を混合した場合(混合液中のスペルミンの濃度は 1.5 μM)、520 nm の SPR 吸収バンドが 660 nm 付近の長波長側にシフトした。更に、より高濃度のスペルミン水溶液(5 μM 以上)の混合によって 700 nm 付近に c-AuNPs の SPR カップリングによる新しい光吸収バンドが観察できた。

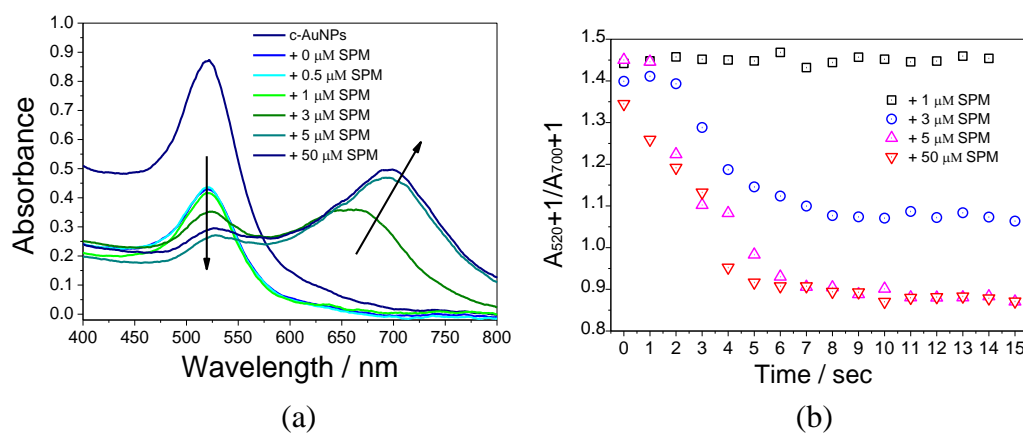


Figure 6.30. (a) UV-vis spectra of c-AuNPs in aqueous solutions of SPM at different concentrations and (b) dynamic responses obtained from the formula of A_{520+1}/A_{700+1} .

c-AuNPs とスペルミンを混合した後の 520 nm と 700 nm の吸光度比を **Figure 6.30b** に示した。5 μM 以上のスペルミン水溶液を混合することによって、700 nm の吸光度が 520 nm の吸光度を上回り、混合してから約 10 秒後に 700 nm の吸光度が最大に達する素早い反応を示した。**Figure 6.31a** の光学イメージから分かるように、3 μM 以上のスペルミン水溶液の混合によって c-AuNPs 水溶液が赤色から紫色へと変色した。しかし、c-AuNPs の凝集による沈殿は見られなかった。**Figure 6.31b** に 5 μM のスペルミンと c-AuNPs の混合水溶液の TEM イメージを示した。このような c-AuNPs の凝集状態の変化は、UV-vis 吸収スペクトル以外に肉眼でも確認できる。

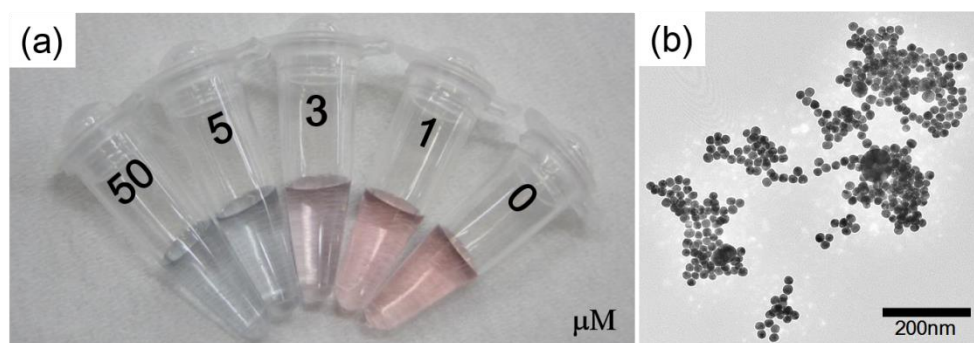


Figure 6.31. (a) Visual color changes of c-AuNPs in aqueous solutions of SPM at different concentrations (from 0 to 50 μM). (b) TEM image of aggregated c-AuNPs in a SPM solution at 2.5 μM .

本研究で用いた 20 nm の c-AuNPs は、約 -0.35 のゼータ電位と約 6.8 の pH を示し、表面が若干負に帯電している。一方、**Figure 6.32** に示すように、0～50 μM のスペルミン水溶液の pH は 8.7 以下である。スペルミンの一级および二级アミノ基の pK_a がそれぞれ 10.9 と 8.9 であることから[85]、スペルミンの全てのアミノ基がプロトン化され、正に帯電していることが分かる。しかし、スペルミン水溶液に c-AuNPs を混合した場合、溶液の pH は、混合前のスペルミン水溶液の pH より低く、7 付近にとどまっている。これは、以下の反応式(7)～(9)に示すように、一级または二级アミノ基のプロトン化によって形成された水酸基イオンが c-AuNPs のカルボキシル基との酸塩基反応によって中和されるためであり、c-AuNPs とスペルミンの酸塩基相互作用による静電的結合を裏付ける。混合溶液中の c-AuNPs とスペルミンの酸塩基相互作用による c-AuNPs の凝集が起こり、700 nm 付近に新たな光吸収バンドが現れたと考えられる。

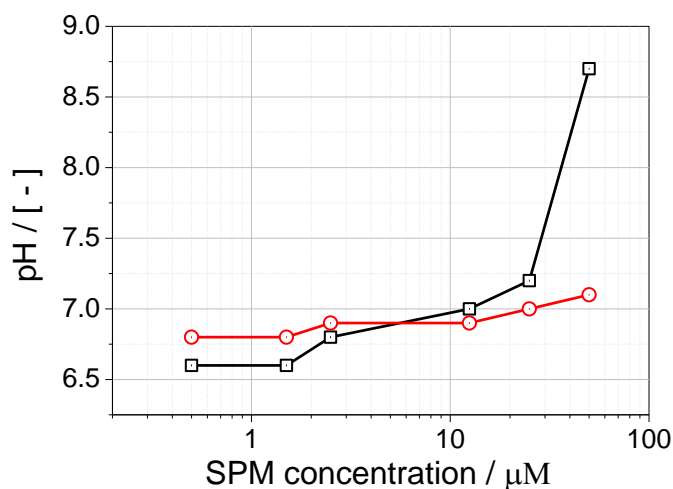
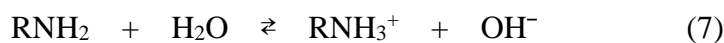


Figure 6.32. pH of SPM solutions at different concentrations with (\circ) and without (\square) c-AuNPs.



スペルミンとの比較に、スペルミジン、ジアミンブタン、ジアミノヘキサン、ジアミドデカンを用いて同様な比色分析を行った。濃度の異なるそれぞれのアミン化合物を c-AuNPs 溶液と混合した後の 520 nm と 700 nm の吸光度比を計算した結果を **Figure 6.33** に示した。c-AuNPs の凝集による 700 nm の光吸収バンドが観測できる濃度は、スペルミン、スペルミジン、ジアミンブタン、ジアミノヘキサン、ジアミドデカンに対して、それぞれ 5, 7, 23, 258 および 25 μM であり、それぞれの検量線の傾きが 0.12, 0.057, 0.018, 0.0090 および 0.0015 μM^{-1} と小さくなる。スペルミンの変色まで約 10 秒の時間がかかることに對し、スペルミジン、ジアミノヘキサン、ジアミンブタン、ジアミドデカンの反応時間は、それぞれ約 50, 100, 300, 1000 秒と長かった。従って、c-AuNPs はスペルミンまたはスペルミジンに対して比較的に高い検知感度と選択性を示すことが分かる。

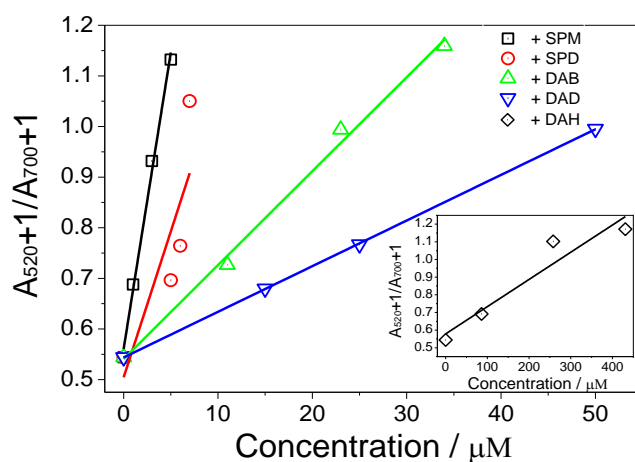


Figure 6.33. Calibration curves of A_{520+1}/A_{700+1} vs. concentrations of amine compounds including c-AuNPs. Inset shows a linear dependence of A_{520+1}/A_{700+1} on the DAH concentration.

スペルミンの pKa の値から分かるよう、スペルミンは水中で 4 つのアミノ基が全て正に帯電している状態を保つ。また、ジアミンブタン、ジアミノヘキサン、ジアミドデカン のジアミン化合物の pKa は、約 11 であり、スペルミンの一級アミノ基の pKa に同等する値である。従って、同様な実験条件下においては、本研究で用いたジアミン化合物も正に帯電していると考えられる。しかし、c-AuNPs は、ジアミン化合物に対して選択性がなく、相対的にポリアミンに高い反応性を示す。これは正に帯電したポリアミンのアミノ基の数が c-AuNPs の凝集に有利に働くためである。

一般的に前立腺がん診断のための尿中スペルミンおよびスペルミジンの検知範囲は、それぞれ $1\sim 10\ \mu\text{M}$ および $10\sim 50\ \mu\text{M}$ と言われている[86]。本研究でのスペルミンおよびスペルミジンに対する検知限界濃度は、両方に対して数 μM 程度であり、尿中ポリアミンの検知に適用可能であると考えられる。

700 nm の光吸収バンドは、ポリアミンの検知に重要な指標となることから、c-AuNPs の溶液量を $150\ \mu\text{L}$ に固定し、 $5\ \mu\text{M}$ のスペルミン水溶液の混合比を変化しながら、混

合溶液の UV-vis スペクトルを測定した(**Figure 6.34a**)。10 μL と 30 μL のスペルミンを添加した場合は、520 nm の吸光度が減少し、50 μL を加えることで 650 nm 付近に新たな吸収バンドが現れ、更に 90, 120, 150 μL の添加量の増加に伴って 700 nm に SPR カップリングによる新たな光吸収バンドが現れた。90 μL のスペルミン水溶液と 150 μL の c-AuNPs 溶液を混合した際に最大の吸光度に達した(**Figure 6.34b**)。その時、一個の c-AuNP 表面に滞在するスペルミン分子数を以下の式(4)を利用して量論的に計算することができる。

$$n_{S/Au} = \frac{C_S \times L_S \times N_A}{n_{Au} \times L_{Au}} \quad (4)$$

n_{Au} と L_{Au} は、それぞれ c-AuNPs 溶液中の粒子の数($n_{Au} = 6.54 \times 10^{11}$ nanoparticles mL^{-1})[87]および溶液の体積($L_{Au} = 150 \mu\text{L}$)である。 C_S と L_S は、スペルミン溶液の濃度($C_S = 5 \mu\text{M}$)および体積($L_S = 90 \mu\text{L}$)を表す。 N_A は、アボガドロ定数($N_A = 6.023 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$)である。これらの値を式(4)に代入すると、一個の c-AuNP の表面に約 2.76×10^9 個のスペルミン分子が存在することが分かる。

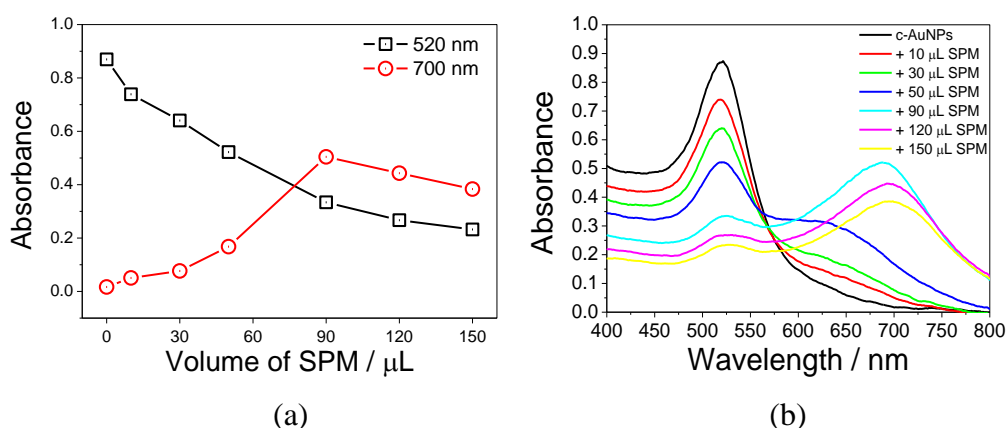


Figure 6.34. (a) UV-vis spectra changes of c-AuNPs due to addition of a different volume of SPM at 5 μ M in water and (b) absorbance changes at 520 and 700 nm.

c-AuNPs を利用した比色分析において、c-AuNPs の粒子サイズは SPR カップリングに影響を与える一つの要素である。粒径が小さくなるにつれて SPR カップリングが減少し、検知能力の低下が予測できる[74,79]。本研究では、粒径が 20 nm および 5 nm の 2 種類の c-AuNPs を使用し、粒子サイズ効果を調べた。Figure 6.35 に 2 種類の c-AuNPs を用いたスペルミン(5 μ M)の検知結果を示した。凝集前の 2 種類の c-AuNPs は、両方とも 520 nm 付近に SPR 吸収バンドをもつ。Figure 6.35a に示す 5 nm の c-AuNPs の場合、スペルミン溶液の添加により反応溶液中の c-AuNPs 濃度が半減し、吸光度が約半分に減少したが、600～700 nm における SPR 吸収バンドの変化は殆ど見られない。一方、Figure 6.35b に示した 20 nm と 5 nm の混合 c-AuNPs では、同じ波長領域において 5 nm の c-AuNPs より SPR 吸収バンドが著しく右側にシフトすることが確認できる。SPR 吸収バンドの長波長側へのシフトは、スペルミンによる c-AuNPs の凝集による SPR カップリングを示唆し、粒径の大きい c-AuNPs を混合することでスペルミンへの応答が向上したことが考えられる。

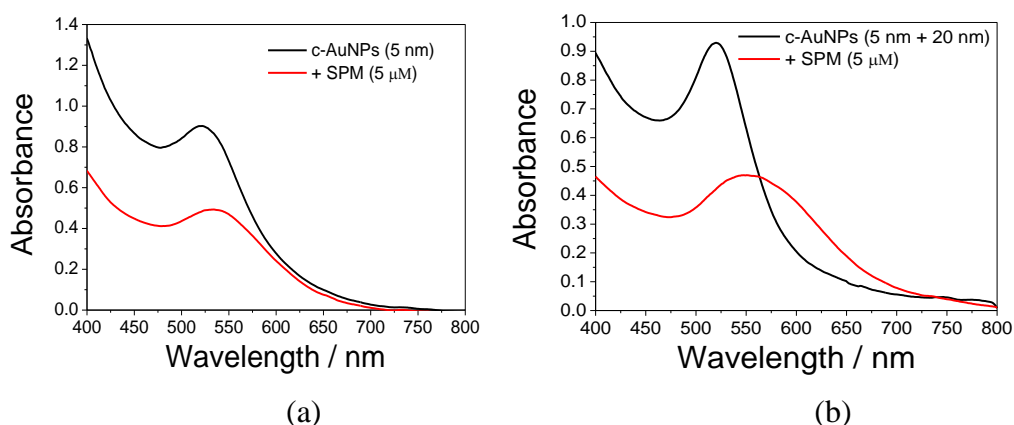


Figure 6.35. UV-vis spectra of c-AuNPs with (a) a diameter of 5 nm and (b) a 1:1 mixture of 5 and 20 nm in diameter in an aqueous solution of SPM at 2.5 μM .

一般的に AuNPs の共鳴振動、すなわち、SPR は、粒径が大きくなると SPR 波長が長波長側にシフトする。これは、AuNPs の粒径が大きくなるにつれて、より波長の長い可視光周波数が表面の自由電子と共鳴しやすくなるためである。一方、AuNPs の凝集状態によっても吸収スペクトルのシフト(SPR カップリング)が起こり、AuNPs 水溶液の色が赤から青または紫に変わる。5 nm の c-AuNPs に比べて 20 nm の c-AuNPs がポリアミンに対して高い応答性を示した理由の一つとして、AuNPs の凝集サイズが関係する。Oishi らは、静電気相互作用に基づいたカチオン性ペプチド検知に、10 nm より大きい粒子サイズの AuNPs が有利であることを報告している[88]。これは、AuNPs の粒子サイズの増加(比表面積の減少)に伴って、粒子間の接触面積が減少し、少ない量の検体でも効果的に AuNPs の凝集が可能であることを示唆する。本実験では、20 nm の c-AuNPs とポリアミンとの反応による最大吸収波長が 700 nm において現れ、Oishi らによって検証された同じ粒子サイズの結果(650 nm)より大きい。これは、Oishi らが用いたカチオン性ペプチドに比べてポリアミン(特にスperlミン)のより柔軟な分子構造や分子サイズが AuNPs の凝集に有利に働いていることを意味する。c-AuNPs の

サイズは、ポリアミンの検知に重要なパラメーターであると言える。

Russel らによるがん患者の尿中ポリアミンに関する報告[89]を参考に、健常者の尿中ポリアミンの検出を行った。更に、尿中にはポリアミン以外に主な共存物質として多くのアミノ酸が含まれることから、アミノ酸による c-AuNPs の凝集可能性を調べた。

健常者 3 名の原尿とそれに前立腺がんの病理学レベルのスペルミン(5 μ M)を添加した尿サンプルを用いて c-AuNPs による比色分析を行った(**Figure 6.36**)。本研究で用いた 20 nm の c-AuNPs によるスペルミンの検知限界は、5 μ M 以下であり、前立腺がん患者の尿中スペルミンが検知可能な濃度である。健常者 3 名(A, B, C, **Figure 6.36b-d**)の原尿と c-AuNPs を混合した場合、520 nm の SPR 吸収バンドがそれぞれ、544, 607, 612 nm 付近の長波長側へとシフトし、混合状態での c-AuNPs の凝集が確認できた。更に、前立腺患者の尿中スペルミンのレベル(5 μ M)に濃度を調整した場合、それぞれの光吸収バンドが 632, 622, 635 nm に大きくシフトした。人によってスペルミンの添加前の SPR 吸収バンドの最大波長に違いが見られたが、スペルミンの添加によって更なる c-AuNPs の凝集が起こったと考えられる。健常者の尿検査から個人差が見られたのは、恐らく尿中に含まれている全ポリアミンの濃度が異なることに起因する。一般的に、前立腺がん患者の尿には、健常者に比べて約 4~6 倍多くポリアミンが含まれると言われている[14]。尿中スペルミンを選択的かつ定量的に評価するためのより詳細な検討が必要であるが、本研究方法は尿中ポリアミンの予備的な検査手法として可能性が高い。

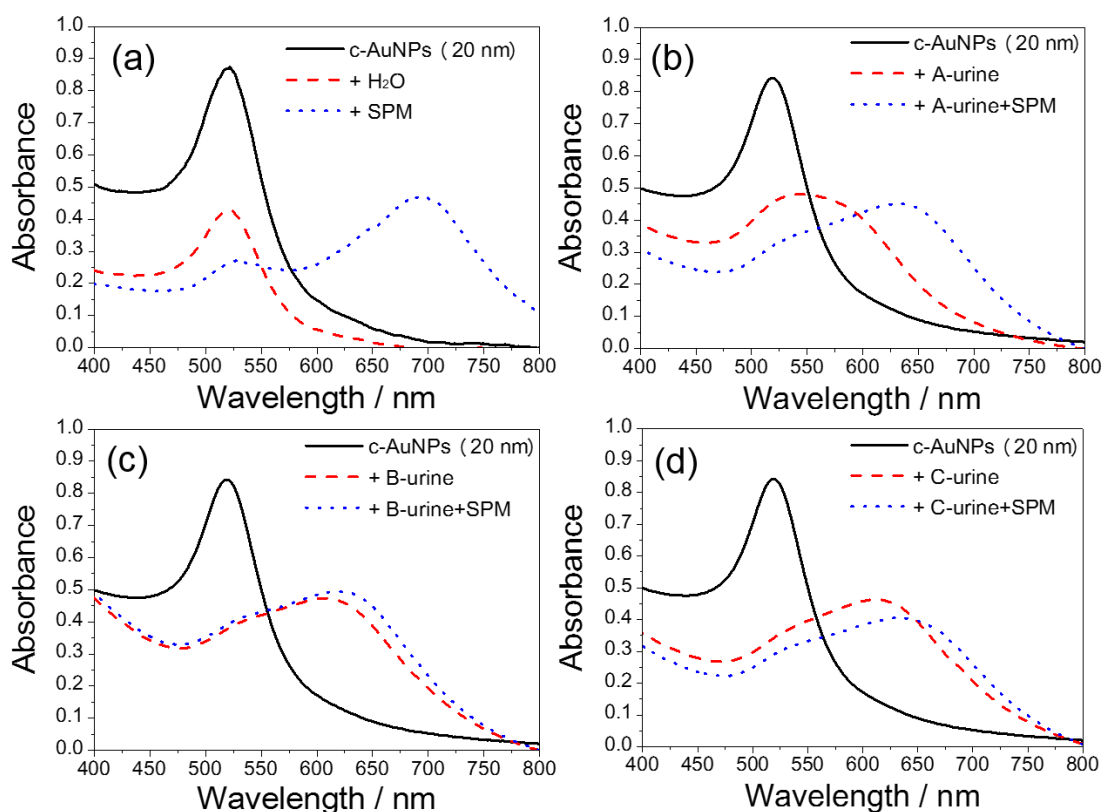


Figure 6.36. UV-vis spectra of c-AuNPs with a diameter of 20 nm (solid line in all figures) when diluted with (a) water and urine samples from three healthy volunteers: (b) A, (c) B, and (d) C with (dotted lines) and without (dashed lines) 2.5 μM SPM, respectively.

Figure 6.37 の UV-vis スペクトルから分かるように、500 μM の高濃度のアミノ酸を混合した場合、c-AuNPs の凝集は見られず、520 nm において c-AuNPs の SPR 吸収バンドのみが確認できた。リシンのように分子内に 2 つのアミノ基をもつ塩基性のアミノ酸であっても c-AuNPs の凝集は起こらない。これは、尿中に混在するアミノ酸による c-AuNPs の凝集可能性はなく、アミノ酸がポリアミンの検知に影響しないことを示唆する。

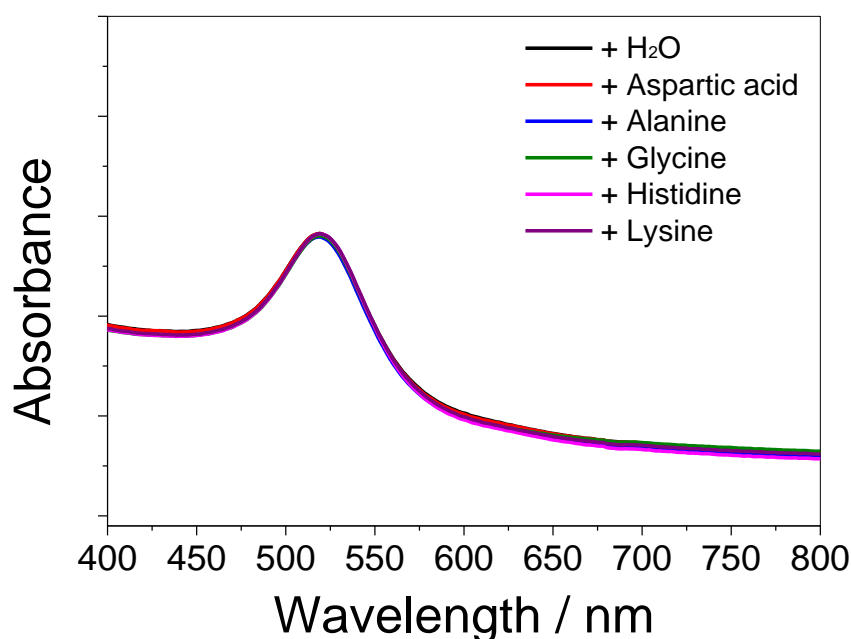


Figure 6.37. UV-vis spectra of c-AuNPs in aqueous solutions of amino acids at 500 μM .

6.3.5 AuNPs/高分子電解質膜を用いた光ガス検知

最近、光ファイバー上の高分子電解質LbL膜の形態変化に基づくガス検知に焦点を当てている[96,97]。Poly(acrylic acid)/poly(allyamine hydrochloride) (PAA/PAH)またはPAA/poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PAA/PDDA)の多層交互積層膜で修飾した長周期格子光ファイバー(LPG)は、高分子電解質多層膜の屈折率(RI)変化によりアンモニアに対する高い感度を示した。カチオン性ポリマーは、PAA層へのアミン化合物の結合に起因して、LPG上へのPAA組織化の補助および薄膜の収縮(薄膜密度の増加)の誘導において2つの役割を果たす。

最近では、LPG繊維上に40～50 nmの範囲の直径を有するシリカナノ粒子(SiO_2NP)からなるLbL多層メソポーラス膜をベースとする新規な有機化合物[98]、アンモニア[99]の検出および物質のRIの測定[100]のための化学センサーもとして使用できることを実証している。従来のゾルゲル技術と比較して、メソポーラスコーティングを形成する

ためのLbL堆積技術の更なる利点は、異なる直径のSiO₂NPを使用することによってコーティング層の厚さを容易に制御する能力にある。しかし、SiO₂NPコーティングの多孔質性質は、低いRIをもたらし、コーティングのRIを増加させるために、機能性材料をメソポーラス膜に注入しなければならない。

本研究では、正に荷電した金ナノ粒子(AuNPs⁺)と陰イオン高分子電解質で自己組織化されたLbL膜に基づく新しい光ガスセンシングの概念を報告する。アニオン性金ナノ粒子の使用に基づく多くの従来のアプローチ[101-104]とは異なり、AuNPs⁺は、PAHおよびPDDAなどの通常のカチオン性ポリマーの役割を果たした。しかし、AuNPs⁺の高いRIおよび独特の表面プラズモン共鳴(SPR)は、特にPAAポリマーとのLbL膜を用いたアンモニアガス検出のための検知能力を改善することを可能にした。

カチオン性ジスルフィド分子の[**1**, (-S(CH₂)₂NHCO(CH₂)₁₀(CH₃)₃N⁺ Br⁻)₂]は、以前の報告書に記載されている方法で合成された[105]。**1**で保護する AuNPs (AuNPs⁺)の合成は、国武らの方法に従って行われた(**Figure 6.38**)[106]。簡潔にまとめると、**1**(0.059 g, 0.16 mmol)を 30 mL の hydrogen tetrachloroaurate (III) tetrahydrate (0.16 mmol)水溶液に添加し、室温で 5 分間攪拌した。更に、混合溶液に新しく調製した sodium tetrahydroborate (5.0 mL, 0.16 mol)水溶液を滴下し、3 時間激しく攪拌し続けた。混合溶液を放冷した後、アセトン(300 mL)を混合物に滴下して、粒子が沈殿するまで過剰のジスルフィドを除去した。形成された沈殿物を孔径 0.1 μm の PTFE 膜を用いて濾過し、アセトンで洗浄して AuNPs⁺を黒色粉末として回収した。

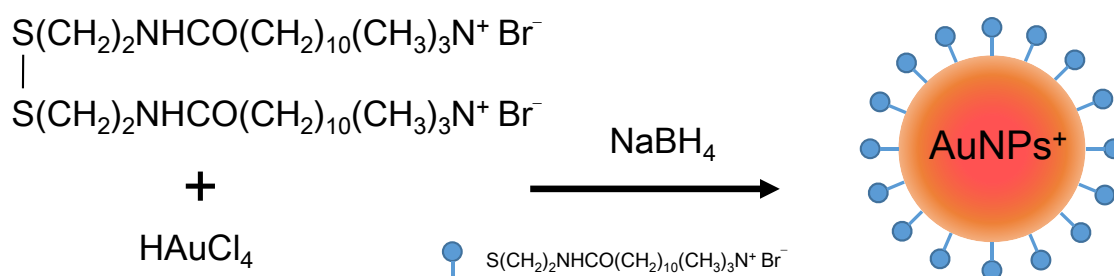


Figure 6.38. Schematic illustration of synthesis of cationic gold nanoparticles (AuNPs⁺).

作製した AuNPs⁺は、水中で安定であり、**Figure 6.39a** に示すように 520 nm で明確な SPR バンドを示した。TEM 観察と DLS 測定の結果から、**Figure 6.39b** に示すように、合成した AuNPs⁺は、平均粒径が約 5 nm であり、参考文献の 16、17 とよく一致している。したがって、**1** で保護した AuNPs⁺の全体の大きさは、約 10 nm であると推定される[16,17]。石英基板上に PAA と PSS の交互層を有する AuNPs⁺の膜堆積に起因する UV-可視スペクトルの変化を **Figure 6.40a** および **b** に示す。膜数が増加するにつれて、吸光度は、200~500 nm のスペクトル領域において増加する。さらに、両方の膜は、可視領域において約 544 nm の UV-vis スペクトルにおいて顕著なバンドを示した。この吸収帯は、二重層数の増加に伴って直線的に増加し、石英基板上で均一な膜成長を示した。**Figure 6.40** は、膜堆積の間に 229 および 544 nm で測定した吸光度の増加を示す。

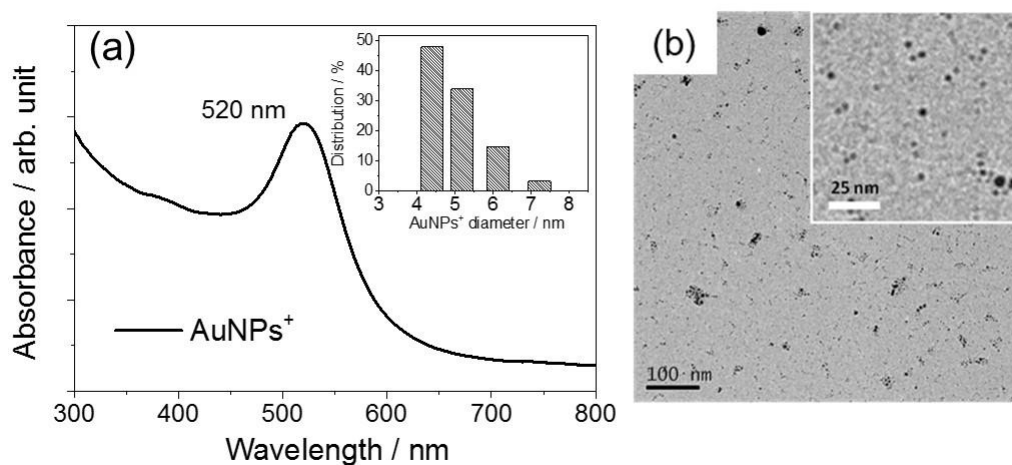


Figure 6.39. (a) UV-vis spectrum of AuNPs⁺ (0.5 mg mL⁻¹ in water) and (b) TEM image of AuNPs⁺. Inset of (a) shows the size distribution diagram of AuNPs⁺.

520 nm にあった AuNPs⁺の SPR バンドは、膜体積後、544 nm に 24 nm のレッドシフトを示した。この現象は、AuNPs⁺が静電的相互作用によって PAA または PSS 層で被覆されたときに、AuNPs⁺の電子(誘電)環境がかなり変化したことによって、説明することができる。その結果、AuNPs⁺間の距離が小さくなり、水中の SPR 吸収ピークがレッドシフトした。興味深いことに、AuNPs⁺/PAA および AuNPs⁺/PSS 膜は、10 回の堆積サイクルが完了した後、544 nm でほぼ同じ吸光度を示した。これは、式(10)と(11)に示したように、PAA が静電相互作用を介して、AuNPs⁺/PSS 多層膜と同様に、AuNPs⁺と交互積層したことを示唆している。

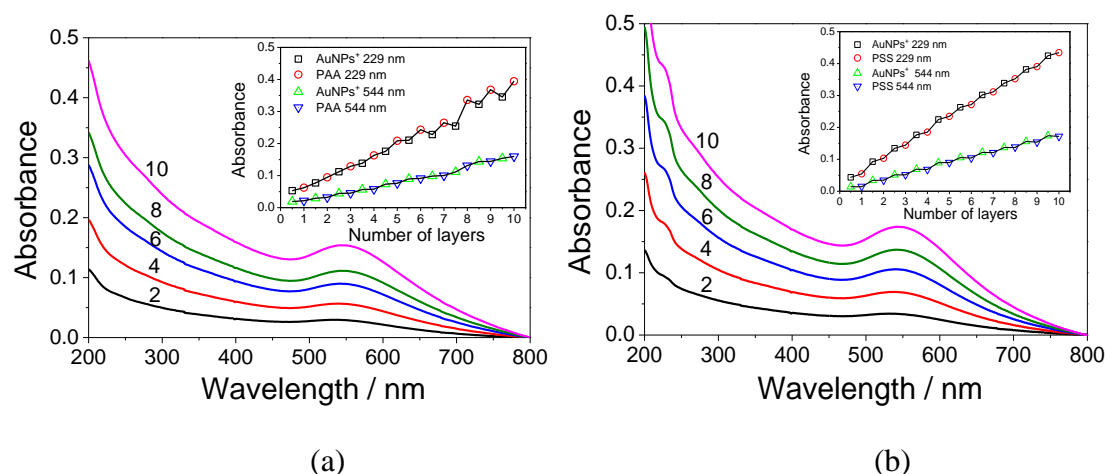
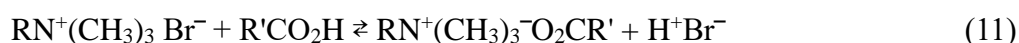


Figure 6.40. UV-vis spectral changes during the 10-cycle film deposition of AuNPs⁺ with an alternate layer of (a) PAA and (b) PSS on quartz substrates. Insets show absorbance increases at 229 and 544 nm.

これは、第4級アンモニウム塩 $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Br}^-$ が安定であり、溶液の pH にほとんど影響されないと思われる。



AuNPs⁺/PAA 膜の場合には、1 wt% アンモニア溶液から蒸発したアンモニアガス 30 分間膜を暴露し、HCl 水溶液(0.1 M)に 15 分間浸漬した後に測定した UV-vis スペクトルは再現可能であった(**Figure 6.41a**)。299 nm と 544 nm での吸光度変化は、5 回の反復試験で 0.043 ± 0.0033 と 0.0053 ± 0.0013 であった(**Figure 6.41b**)。AuNPs⁺/PAA 膜におけるこの光学的変化は、PAA の脱プロトン化またはプロトン化に起因する。これは、通常 LbL 多層膜の形態変化を誘発する[8]。膜中の PAA ポリマー層の膨潤および収縮は、AuNPs⁺の SPR 吸収に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、544 nm

での SPR 吸収ピークに波長シフトは、観察されなかった。恐らく、520 nm から 544 nm への大きな AuNPs⁺の SPR バンドの波長シフトは、膜中の AuNPs⁺の過密な充填に起因すると考えられる。

Figure 6.41c は、膜をアンモニアガスに 30 分間暴露し、HCl 水溶液に 15 分間浸漬した後の AuNPs⁺/PSS の 10 層膜の UV-vis スペクトルを示す繰り返し試験から有意な変化は、観察されなかった (**Figure 6.41**)。この結果は、アンモニアおよび HCl に対する PSS の応答がないことに起因する。

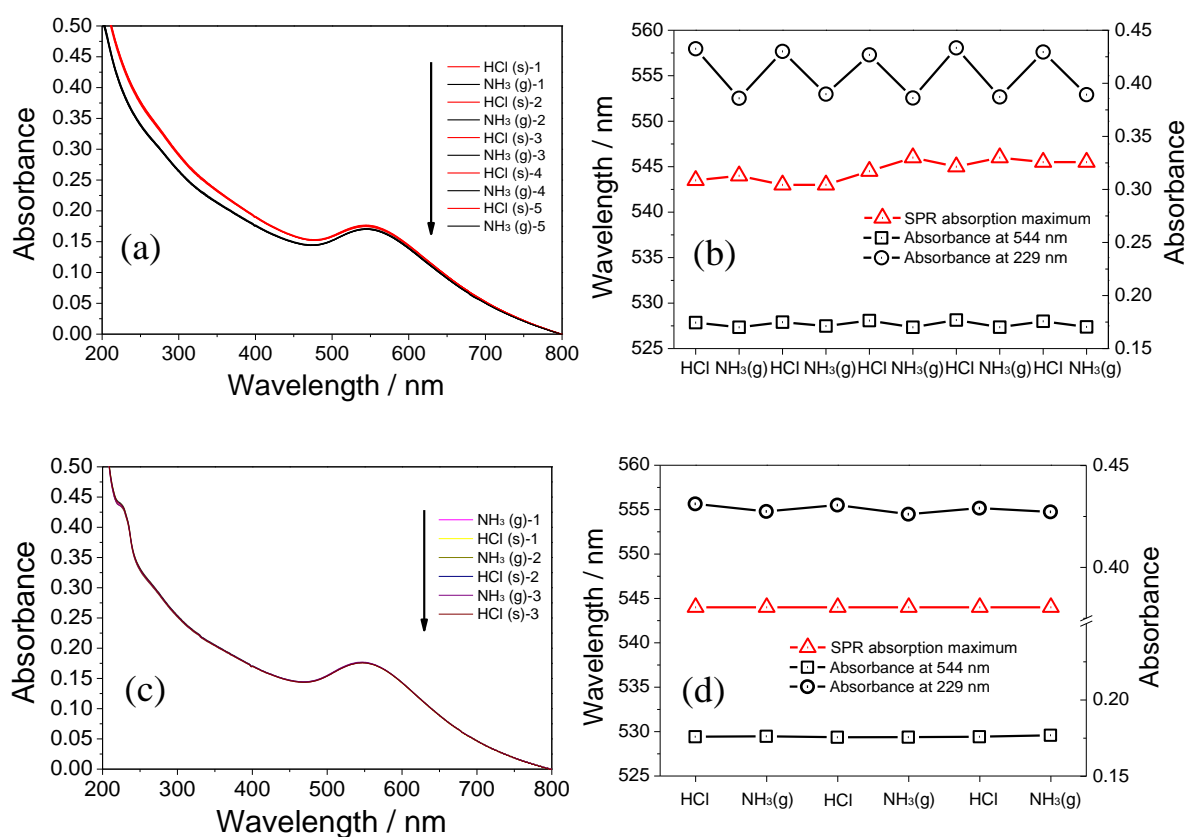


Figure 6.41. (a, c) UV-vis spectra measured after the film was exposed to the ammonia gas vaporized from a solution of 1 wt% ammonia for 30 min and immersed in a solution of HCl in water (0.1 M) for 15 min for the 10-cycle AuNPs⁺/PAA and AuNPs⁺/PSS films, respectively. (b, d) Shifts of SPR absorption maximum and absorbance changes at 299 and 544 nm for each film.

膜組成およびアンモニアの結合メカニズムを調べるために、FTIR測定を行った。

Figure 6.42は、アンモニアガスへの暴露前後およびHCl処理後のカチオン性ジスルフィド、**1**、およびAuNPs⁺/PAAの10層膜のFTIRスペクトルを示す。**Figure 6.42a**に示すように、3296、1639、1547 cm⁻¹の3つの固有ピークは、N-Hの伸縮バンドおよびアミド基(-CONH-)の二種類のC-O伸縮バンドに対応する。更に、2917および2850 cm⁻¹のピークは、それぞれ、**1**のCH₂-基と-N-CH₃-基のC-H伸縮バンドに割り当てられる。一方、PAAのフリーな-COOH基のC-O伸縮に起因するピークは、**Figure 6.42b**の1720 cm⁻¹に観察された。PAAカルボキシレート基(-COO⁻)の非対称および対称C-O伸縮バンドは、それぞれ1544(強い)および1414 cm⁻¹(非常に弱い)で観察された。1453 cm⁻¹付近の小さなブロードなピークは、**1**およびPAAの-CH₂-基のC-H伸縮振動に起因する可能性がある。これらの結果は、PAAがLbL膜にうまく使用され、PAAのフリーなカルボキシル基が残っており、アンモニアの選択的な結合部位として使用できることを示している。

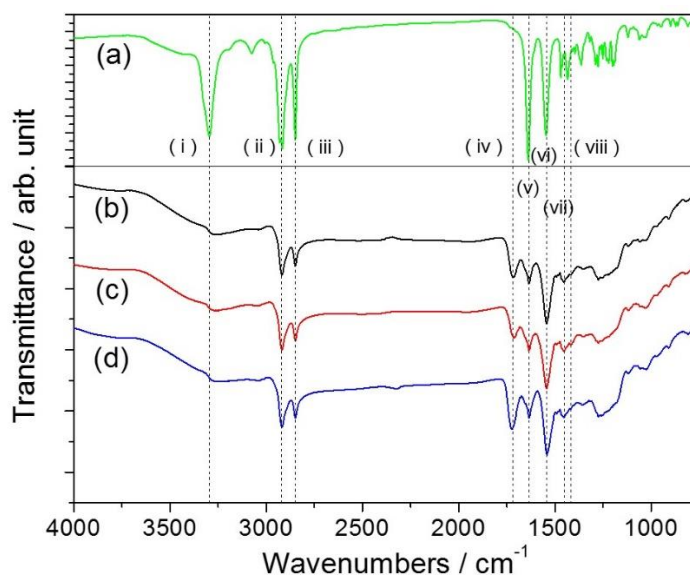


Figure 6.42. Comparison of FTIR spectra of (a) **1** and a 10-cycle AuNPs⁺/PAA film on a gold-coated glass substrate (b) before and (c) after exposure to ammonia gas and (d) after HCl treatment. Adopted wavenumbers: (i) 3296, (ii) 2917, (iii) 2850, (iv) 1720, (v) 1639, (vi) 1544, (vii) 1453, and (viii) 1414 cm⁻¹.

アンモニアガスに暴露されたAuNPs⁺/PAA膜のIRスペクトルを**Figure 6.42c**に示す。膜がアンモニアガスに曝された後、1720 cm⁻¹のC-O伸縮振動(-COOH)のピークの強度は減少した。一般に、-COOH官能部分は、酸-塩基反応によって-COO⁻基へ変換する。しかし、膜をアンモニアガスに暴露した結果、1414および1544 cm⁻¹に-COO⁻基の対称および非対称の伸縮振動に起因するピークの強度に明確な変化はなかった。恐らく、この結果は、1544 cm⁻¹の-COO⁻基の弱い非対称C-O伸縮が1547 cm⁻¹の比較強いC-O伸縮のアミド基(-CONH-)と重なっている。更に、1570 cm⁻¹のアミド基のC-O伸縮は、AuNPs⁺上の自己組織化アルキルチオレート間の水素結合を介してより強くなる。一方、3296および1639 cm⁻¹のアミド基の他のピークは、水素結合によって減衰していることが観察される。興味深いことに、**Figure 6.42d**のように、PAAに関連するピークの強度は、膜をHClで処理した後に回復し、1414 cm⁻¹での透過率の減少および1720 cm⁻¹での透過率の増加を示した。

Figure 6.43 に示すように、AuNPs⁺/PAA 膜の厚さの減少は、膜密度の増加に関する我々の仮説を証明する。アンモニアへの結合のための検出機構は、アンモニアとPAAのカルボン酸部分との間の酸-塩基相互作用に基づいていると考えることができる。その結果、COOH官能部分は、-COO⁻への変換を受け、PAA層とAuNPs⁺層との間の静電的相互作用を増強することができる。PAAがPDDAまたはPAHと結合した場合に得られた結果と同様の感知性能が観察される[90,91]。FTIRとAFMの結果に基づいて、AuNPs⁺/PAA膜の収縮は、アンモニアの吸着によって引き起こされると結論付けることができ、これは主にAuNP⁺の近UV領域で大きな光学的変化をもたらす。

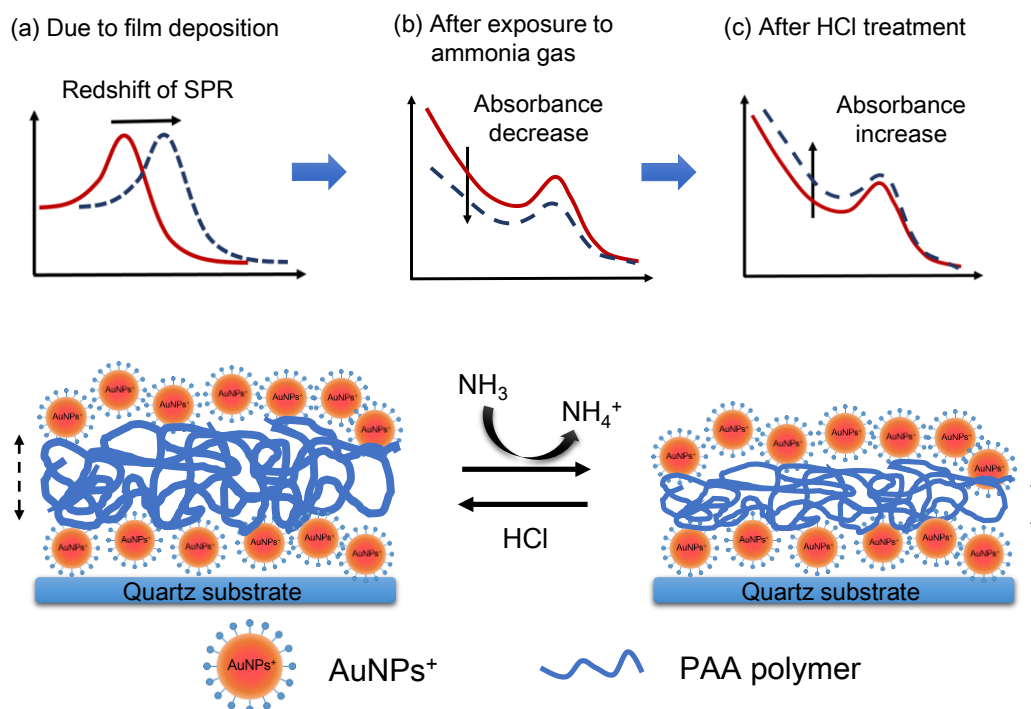


Figure 6.43. Schematic illustration of the correlation between the optical and morphological changes in the AuNPs⁺/PAA film due to exposure to ammonia gas and HCl treatment.

6.4 結論

長周期格子光ファイバー (LPG) を用いた低分子代謝物の検知成果を総括し、記述した。LPG は、ファイバーコア屈折率の周期的な変調であり、ファイバー周囲の屈折率を敏感に捉えることができる。このような物理パラメーターである屈折率を高感度に応答する光ファイバーに高分子電解質、シリカナノ粒子、ポルフィリン、酸化チタンなどのナノ薄膜 (人工レセプター) を修飾することで、LPG は、高感度かつ選択的な低分子代謝物のセンサーとして応用できることを証明した。

クエン酸で保護されたアニオン性 c-AuNPs の凝集に基づいたポリアミンの比色分析を試みた。分子内に最も多くのアミノ基を有するスペルミンと c-AuNPs の凝集によって、520 nm の c-AuNPs の SPR 光吸収バンドの減少と、700 nm 付近の c-AuNPs の凝集

による新たな光吸収バンドの増加が確認でき、それに伴って c-AuNPs 溶液が赤色から紫色へと変色した。本研究で用いた c-AuNPs は、粒子の分散性がよく、特に粒子サイズが均一である利点を有し、より効果的比色分析が期待できる。今後、実験条件の最適化や検知感度の向上を通して、前立腺がんの検査のための具体的な方法論の確立を目指す。

カチオン性金ナノ粒子(AuNPs⁺)と poly(acrylic acid)(PAA)や poly(sodium 4-styrene sulfonate)(PSS)のアニオン性高分子電解質の自己組織化 layer-by-layer(LbL)多層膜を利用した光学ガス検知を実証した。AuNPs⁺/PAA 膜は、アンモニアに対して光学的に敏感であり、膜の応答性は HCl 処理によって再現可能であったが、AuNPs⁺/PSS 膜については応答が観察されなかった。現在のアプローチは、ナノ粒子によるガス拡散および電気化学的特性の改善およびアルキルチオレートに自己組織化された AuNPs が疎水性化合物への選択性などのガス検知のための可能性を提供する。

第七章 結論

がんは世界各国において最も主要な死因の一つであり、がんの早期発見が医療分野の重要な課題となっている。揮発性有機化合物 (VOC) は代謝物としてヒトの体液などに多く存在し、近年、被験者に苦痛を与えない非侵襲的疾患診断のマーカーとして関心を集めている。本論文は、水中にわずかに存在する VOC を効率よく抽出できる薄膜型吸着デバイスを開発し、それを体液などの生体試料の分析に用いることで体内から排出される VOC の疾患相関を解明することを目的とした。本論文で達成したことは、以下に示す。

1. ゼオライトの一種である ZSM-5 とポリジメチルシロキサン (PDMS) の複合薄膜を用いたマイクロ抽出法 (TFME) を組み合わせた新規ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法の開発に成功し、ppt レベルの高感度定性・定量分析を可能にした。
2. 健常者の体液 (唾液、尿) に含まれる VOC 成分について、TFME-GC-MS 法を用いた高感度分析と統計処理を併用したデータ解析によって、体液から発見された VOC が内因性または外因性物質であるかの区別を可能にした。また、口腔がん患者の唾液に含まれる VOC からがんの高い相関を示すバイオマーカーの存在を明らかにした。
3. ヒト由来子宮頸がん細胞 (HeLa) および肝臓がん細胞 (HepG2) の連続培養を行い、HeLa 細胞から 10 成分、HepG2 細胞から 8 成分のバイオマーカーの候補物質を発見した。更に、HepG2 細胞培養中に増加傾向を示した 1-butanol を任意の濃度のガス状にして培養中の細胞に暴露した結果、細胞数と VOC 代謝パターンの著しい変動が観察され、がん細胞の活動が特定の VOC 代謝の化学平衡に強く依存することを世界初めて実験から明らかにした。
4. 非侵襲的がん診断デバイスの開発に光ファイバーと機能性材料を組み合わせた種々のセンサー設計を検討し、光学検知に基づいた高感度・高選択性バイオセンサ

の開発に必要な基盤技術を確立した。

参考文献:

第 1 章

1. WHO, World Cancer Report 2008, edited by P. Boyle and B. Levin, IARC Press, Lyon, France, 2008.
2. Global cancer facts figures, American Cancer Society.
3. 平成 26 年人口動態統計月報年計(概数)の概況、厚生労働省、日本.
4. Atkinson, A. J. *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **69**, 89-95, doi:10.1067/mcp.2001.113989 (2001).
5. Jellum, E., Stokke, O. & Eldjarn, L. Application of gas chromatography, mass spectrometry, and computer methods in clinical biochemistry. *Analytical Chemistry* **45**, 1099-1106 (1973).
6. 荒川 憲昭, 平野 久. 培養細胞を起点としたバイオマーカー探索と診断応用、*Proteome Letters* **1**, 81-87 (2016).
7. Barallobre-Barreiro, J., Chung, Y. L. & Mayr, M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. *Revista española de cardiología (English ed.)* **66**, 657-661, doi:10.1016/j.rec.2013.04.009 (2013).
8. Shibamoto, K., Mochizuki, M., Kusuhara, M. Aroma Therapy in Anti-Aging Medicine. *Japanese Society of Anti-Aging Medicine* **7**, 55-59 (2010).
9. Masatoshi, K., Kenichi, U., Vincent, Z., & Kunihide, H. Disease and Smell: “Byoshu”, *Anti-Aging Medicine* **7** (6), 66-72 (2010).
10. Broza, Y. Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A. & Haick, H. Hybrid Volatolomics and Disease Detection. *Angewandte Chemie - International Edition* **54**, 11036-11048, doi:10.1002/anie.201500153 (2015).
11. Phillips, M. *et al.* Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **729**, 75-88, doi:10.1016/S0378-4347(99)00127-9 (1999).
12. Thalakkotur, L. M., Prabhahari, P. S. A. & Biji, P, Technologies for Clinical Diagnosis Using Expired Human Breath Analysis, *Diagnostics (Basel)* **5**(1), 27–60, doi:10.3390/diagnostics5010027 (2015).
13. <https://ja.wikipedia.org/wiki/四診>、2017 年 1 月 30 日にアクセス.
14. Niimura, Y., Matsui, A. & Touhara, K. Extreme expansion of the olfactory receptor

- gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Research* **24**, 1485-1496, doi:10.1101/gr.169532.113 (2014).
15. Kaneko-Goto, T. *et al.* Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling. *Journal of Neuroscience* **33**, 12987-12996, doi:10.1523/JNEUROSCI.4948-12.2013 (2013).
 16. Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187 (1991).
 17. Buck, L. B. The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* **100**, 611-618 (2000).
 18. 東原、「化学と生物」、41, 2003 から引用.
 19. Kanashiro-Takeuchi, R. M. *et al.* Cardioprotective effects of growth hormone-releasing hormone agonist after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2604-2609, doi:10.1073/pnas.0914138107 (2010).
 20. Kiriya, D. *et al.* Meter-long and robust supramolecular strands encapsulated in hydrogel jackets. *Angewandte Chemie - International Edition* **51**, 1553-1557, doi:10.1002/anie.201104043 (2012).
 21. 「無脊椎動物の感覚・脳・行動の比較行動生理学」から引用.
 22. Pauling, L., Robinson, A. B., Teranishi, R. & Cary, P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 2374-2376 (1971).
 23. 「メタボロミクスとメタボノミクス」、日本分析化学会、分析 2009, 7.
 24. Griffin, J. L. & Shockcor, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **4**, 551-561 (2004).
 25. Wishart, D. S., Mandal, R., Stanislaus, A. & Ramirez-Gaona, M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites* **6**, doi:10.3390/metabo6010010 (2016).
 26. Probert, C. S. J. *et al.* Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* **18**, 337-343 (2009).
 27. Cháfer-Pericás, C., Campíns-Falcó, P. & Herráez-Hernández, R. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **333**, 328-335, doi:10.1016/j.ab.2004.05.056 (2004).
 28. Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry* **62**, 2145-2148 (1990).

29. Zhang, Z. & Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **65**, 1843-1852 (1993).
30. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* **902**, 167-194, doi:10.1016/S0021-9673(00)00934-1 (2000).
31. www.sigmaaldrich.com/japan/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html, 2017 年 2 月 6 日にアクセス.
32. ISI Web of Knowledge から引用.
33. Kataoka, H., Lord, H. L. & Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* **880**, 35-62, doi:10.1016/S0021-9673(00)00309-5 (2000).
34. Pawliszyn, J. Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science* **38**, 270-278 (2000).
35. Lee, H., Kim, H. J. & Kwon, J. H. Determination of Henry's law constant using diffusion in air and water boundary layers. *Journal of Chemical and Engineering Data* **57**, 3296-3302, doi:10.1021/je300954s (2012).
36. Mackay, D. & Shiu, W. Y. A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **10**, 1175-1199, doi:10.1063/1.555654 (1981).
37. Bruheim, I., Liu, X. & Pawliszyn, J. Thin-film microextraction. *Analytical Chemistry* **75**, 1002-1010, doi:10.1021/ac026162q (2003).
38. Reyes-Garcés, N., Bojko, B., Hein, D. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction Devices Prepared on Plastic Support as Potential Single-Use Samplers for Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry* **87**, 9722-9730, doi:10.1021/acs.analchem.5b01849 (2015).
39. Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M. & Pawliszyn, J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Analytica Chimica Acta* **856**, 35-45, doi:10.1016/j.aca.2014.11.029 (2015).
40. Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T. & Pawliszyn, J. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* **804**, 111-119, doi:10.1016/j.aca.2013.09.056 (2013).
41. Riazi Kermani, F. & Pawliszyn, J. Sorbent coated glass wool fabric as a thin film microextraction device. *Analytical Chemistry* **84**, 8990-8995, doi:10.1021/ac301861z (2012).
42. Scopus Web reference search site, 2016 年 11 月 18 日にアクセス.
43. Lamberti, A., Marasso, S. L. & Cocuzza, M. PDMS membranes with tunable gas

- permeability for microfluidic applications. *RSC Advances* **4**, 61415-61419, doi:10.1039/c4ra12934b (2014).
44. Berean, K. *et al.* The effect of crosslinking temperature on the permeability of PDMS membranes: Evidence of extraordinary CO₂ and CH₄ gas permeation. *Separation and Purification Technology* **122**, 96-104, doi:10.1016/j.seppur.2013.11.006 (2014).
 45. Dixon, E. *et al.* Solid-phase microextraction and the human fecal VOC metabolome. *PLoS ONE* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0018471 (2011).
 46. Anizan, S. *et al.* A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 6652-6660, doi:10.1016/j.chroma.2010.04.062 (2010).
 47. Filipiak, W. *et al.* Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell International* **8**, doi:10.1186/1475-2867-8-17 (2008).
 48. Mochalski, P. *et al.* Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. *Cancer Cell International* **13**, doi:10.1186/1475-2867-13-72 (2013).
 49. Hanai, Y. *et al.* Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell International* **12**, doi:10.1186/1475-2867-12-7 (2012).
 50. Poli, D. *et al.* Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: Cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respiratory Research* **6**, doi:10.1186/1465-9921-6-71 (2005).
 51. Zhang, S., Du, Z. & Li, G. Layer-by-layer fabrication of chemical-bonded graphene coating for solid-phase microextraction. *Analytical chemistry* **83**, 7531-7541 (2011).
 52. Zhang, Y. *et al.* Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs. *Theranostics* **4**, 154-162, doi:10.7150/thno.7560 (2014).
 53. Wardencki, W., Michulec, M. & Curyło, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology* **39**, 703-717, doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00839.x (2004).
 54. Yu, H., Ho, T. D. & Anderson, J. L. Ionic liquid and polymeric ionic liquid coatings in solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **45**, 219-232, doi:10.1016/j.trac.2012.10.016 (2013).
 55. Turiel, E., Tadeo, J. L. & Martin-Esteban, A. Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **79**, 3099-3104, doi:10.1021/ac062387f (2007).

56. Koster, E. H. M., Crescenzi, C., Den Hoedt, W., Ensing, K. & De Jong, G. J. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **73**, 3140-3145, doi:10.1021/ac001331x (2001).
57. Feng, J., Sun, M., Li, J., Liu, X. & Jiang, S. A novel silver-coated solid-phase microextraction metal fiber based on electroless plating technique. *Analytica Chimica Acta* **701**, 174-180, doi:10.1016/j.aca.2011.05.040 (2011).
58. Ghasemi, E. & Sillanpää, M. Optimization of headspace solid phase microextraction based on nano-structured ZnO combined with gas chromatography-mass spectrometry for preconcentration and determination of ultra-traces of chlorobenzenes in environmental samples. *Talanta* **130**, 322-327, doi:10.1016/j.talanta.2014.06.030 (2014).
59. Rastkari, N., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Shafiee, A. & Yunesian, M. Single-walled carbon nanotubes as solid-phase microextraction adsorbent for the determination of low-level concentrations of butyltin compounds in seawater. *Analytica Chimica Acta* **662**, 90-96, doi:10.1016/j.aca.2009.12.035 (2010).
60. Wang, J. X., Jiang, D. Q., Gu, Z. Y. & Yan, X. P. Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* **1137**, 8-14, doi:10.1016/j.chroma.2006.10.003 (2006).
61. Jiménez-Soto, J. M., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. Carbon nanocones/disks as new coating for solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3341-3347, doi:10.1016/j.chroma.2010.03.016 (2010).
62. Sun, M. *et al.* Development of a solid-phase microextraction fiber by the chemical binding of graphene oxide on a silver-coated stainless-steel wire with an ionic liquid as the crosslinking agent. *Journal of Separation Science* **37**, 3691-3698, doi:10.1002/jssc.201400843 (2014).
63. Sun, M. *et al.* Graphene coating bonded onto stainless steel wire as a solid-phase microextraction fiber. *Talanta* **134**, 200-205, doi:10.1016/j.talanta.2014.11.005 (2015).
64. Chen, J. *et al.* Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Analytica Chimica Acta* **678**, 44-49, doi:10.1016/j.aca.2010.08.008 (2010).
65. Zhang, S., Yang, Q., Wang, W., Wang, C. & Wang, Z. Covalent Bonding of Metal-Organic Framework-5/Graphene Oxide Hybrid Composite to Stainless Steel Fiber for Solid-Phase Microextraction of Triazole Fungicides from Fruit and Vegetable Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 2792-2801,

- doi:10.1021/acs.jafc.5b05831 (2016).
66. Zhan, Y., Musteata, F. M., Basset, F. A. & Pawliszyn, J. Determination of free and deconjugated testosterone and epitestosterone in urine using SPME and LC-MS/MS. *Bioanalysis* **3**, 23-30, doi:10.4155/bio.10.177 (2011).
67. Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T. & Pawliszyn, J. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* **804**, 111-119, doi:10.1016/j.aca.2013.09.056 (2013).
68. Rodriguez-Lafuente, A., Mirnaghi, F. S. & Pawliszyn, J. Determination of cocaine and methadone in urine samples by thin-film solid-phase microextraction and direct analysis in real time (DART) coupled with tandem mass spectrometry Anti-doping Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 9723-9727, doi:10.1007/s00216-013-6993-z (2013).
69. Riazi Kermani, F. & Pawliszyn, J. Sorbent coated glass wool fabric as a thin film microextraction device. *Analytical Chemistry* **84**, 8990-8995, doi:10.1021/ac301861z (2012).
70. Grandy, J. J., Boyaci, E. & Pawliszyn, J. Development of a Carbon Mesh Supported Thin Film Microextraction Membrane As a Means to Lower the Detection Limits of Benchtop and Portable GC/MS Instrumentation. *Analytical Chemistry* **88**, 1760-1767, doi:10.1021/acs.analchem.5b04008 (2016).
71. Chen, J. *et al.* Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Analytica Chimica Acta* **678**, 44-49, doi:10.1016/j.aca.2010.08.008 (2010).
72. Zhang, S., Du, Z. & Li, G. Layer-by-layer fabrication of chemical-bonded graphene coating for solid-phase microextraction. *Analytical chemistry* **83**, 7531-7541 (2011).
73. Romero, V., Costas-Mora, I., Lavilla, I. & Bendicho, C. Headspace thin-film microextraction onto graphene membranes for specific detection of methyl(cyclopentadienyl)-tricarbonyl manganese in water samples by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* **126**, 65-70, doi:10.1016/j.sab.2016.10.011 (2016).
74. Huang, J., Deng, H., Song, D. & Xu, H. Electrospun polystyrene/graphene nanofiber film as a novel adsorbent of thin film microextraction for extraction of aldehydes in human exhaled breath condensates. *Analytica Chimica Acta* **878**, 102-108, doi:10.1016/j.aca.2015.03.053 (2015).
75. Wang, J. X., Jiang, D. Q., Gu, Z. Y. & Yan, X. P. Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection.

- Journal of Chromatography A* **1137**, 8-14, doi:10.1016/j.chroma.2006.10.003 (2006).
76. He, X. M. *et al.* Electrospun polystyrene/oxidized carbon nanotubes film as both sorbent for thin film microextraction and matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1351**, 29-36, doi:10.1016/j.chroma.2014.05.045 (2014).
77. Cudjoe, E., Vuckovic, D., Hein, D. & Pawliszyn, J. Investigation of the effect of the extraction phase geometry on the performance of automated solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **81**, 4226-4232, doi:10.1021/ac802524w (2009).
78. Mirnaghi, F. S. & Pawliszyn, J. Reusable solid-phase microextraction coating for direct immersion whole-blood analysis and extracted blood spot sampling coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and direct analysis in real time-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **84**, 8301-8309, doi:10.1021/ac3018229 (2012).
79. Reyes-Garcés, N., Bojko, B., Hein, D. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction Devices Prepared on Plastic Support as Potential Single-Use Samplers for Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry* **87**, 9722-9730, doi:10.1021/acs.analchem.5b01849 (2015).
80. Karimi, S., Talebpour, Z. & Adib, N. Sorptive thin film microextraction followed by direct solid state spectrofluorimetry: A simple, rapid and sensitive method for determination of carvedilol in human plasma. *Analytica Chimica Acta*, doi:10.1016/j.aca.2016.04.025 (2016).
81. Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M. & Pawliszyn, J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Analytica Chimica Acta* **856**, 35-45, doi:10.1016/j.aca.2014.11.029 (2015).
82. Boyaci, E., Gorynski, K., Rodriguez-Lafuente, A., Bojko, B. & Pawliszyn, J. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. *Analytica Chimica Acta* **809**, 69-81, doi:10.1016/j.aca.2013.11.056 (2014).
83. Wang, C. H., Ma, X. X., Wang, C., Wu, Q. H. & Wang, Z. Poly(vinylidene fluoride) membrane based thin film microextraction for enrichment of benzoylurea insecticides from water samples followed by their determination with HPLC. *Chinese Chemical Letters* **25**, 1625-1629, doi:10.1016/j.cclet.2014.06.018 (2014).
84. Wu, J. & Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction based on polypyrrole films with different counter ions. *Analytica Chimica Acta* **520**, 257-264,

- doi:10.1016/j.aca.2004.05.019 (2004).
85. Fei, T., Li, H., Ding, M., Ito, M. & Lin, J. M. Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly(ethylene glycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Separation Science* **34**, 1599-1606, doi:10.1002/jssc.201100225 (2011).
 86. Diwan, A. *et al.* Porous, High Capacity Coatings for Solid Phase Microextraction by Sputtering. *Analytical Chemistry* **88**, 1593-1600, doi:10.1021/acs.analchem.5b03181 (2016).
 87. Gorynski, K. *et al.* Development of SPME method for concomitant sample preparation of rocuronium bromide and tranexamic acid in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **92**, 183-192, doi:10.1016/j.jpba.2014.01.026 (2014).
 88. Yang, P., Lau, C., Liu, X. & Lu, J. Direct solid-support sample loading for fast cataluminescence determination of acetone in human plasma. *Analytical Chemistry* **79**, 8476-8484, doi:10.1021/ac0702488 (2007).
 89. Zhang, S., Yang, Q., Wang, W., Wang, C. & Wang, Z. Covalent Bonding of Metal-Organic Framework-5/Graphene Oxide Hybrid Composite to Stainless Steel Fiber for Solid-Phase Microextraction of Triazole Fungicides from Fruit and Vegetable Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 2792-2801, doi:10.1021/acs.jafc.5b05831 (2016).
 90. Cui, X. Y. *et al.* In situ hydrothermal growth of metal-organic framework 199 films on stainless steel fibers for solid-phase microextraction of gaseous benzene homologues. *Analytical Chemistry* **81**, 9771-9777, doi:10.1021/ac901663x (2009).
 91. Zheng, J. *et al.* In situ growth of IRMOF-3 combined with ionic liquids to prepare solid-phase microextraction fibers. *Analytica Chimica Acta* **829**, 22-27, doi:10.1016/j.aca.2014.04.039 (2014).
 92. Lan, H., Pan, D., Sun, Y., Guo, Y. & Wu, Z. Thin metal organic frameworks coatings by cathodic electrodeposition for solid-phase microextraction and analysis of trace exogenous estrogens in milk. *Analytica Chimica Acta* **937**, 53-60, doi:10.1016/j.aca.2016.07.041 (2016).
 93. He, C. T. *et al.* A porous coordination framework for highly sensitive and selective solid-phase microextraction of non-polar volatile organic compounds. *Chemical Science* **4**, 351-356, doi:10.1039/c2sc21181e (2013).
 94. Boyaci, E. & Pawliszyn, J. Micelle assisted thin-film solid phase microextraction: A new approach for determination of quaternary ammonium compounds in environmental samples. *Analytical Chemistry* **86**, 8916-8921, doi:10.1021/ac5015673

- (2014).
95. Deng, Z. *et al.* Headspace thin-film microextraction coupled with surface-enhanced raman scattering as a facile method for reproducible and specific detection of sulfur dioxide in wine. *Analytical Chemistry* **87**, 633-640, doi:10.1021/ac503341g (2015).
 96. Zeng, J. *et al.* Octadecyltrimethoxysilane functionalized ZnO nanorods as a novel coating for solid-phase microextraction with strong hydrophobic surface. *Analyst* **137**, 4295-4301, doi:10.1039/c2an35542f (2012).
 97. Matin, A. A., Biparva, P., Amanzadeh, H. & Farhadi, K. Zinc/Aluminum layered double hydroxide-titanium dioxide composite nanosheet film as novel solid phase microextraction fiber for the gas chromatographic determination of valproic acid. *Talanta* **103**, 207-213, doi:10.1016/j.talanta.2012.10.034 (2013).
 98. Jiang, R. & Pawliszyn, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **39**, 245-253, doi:10.1016/j.trac.2012.07.005 (2012).
 99. Bakangura, E., Wu, L., Ge, L., Yang, Z. & Xu, T. Mixed matrix proton exchange membranes for fuel cells: State of the art and perspectives. *Progress in Polymer Science*, doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.11.004 (2015).
 100. Li, R., Zhang, L. & Wang, P. Rational design of nanomaterials for water treatment. *Nanoscale* **7**, 17167-17194, doi:10.1039/c5nr04870b (2015).
 101. Kokotailo, G. T., Lawton, S. L., Olson, D. H. & Meier, W. M. Structure of synthetic zeolite ZSM-5. *Nature* **272**, 437-438, doi:10.1038/272437a0 (1978).
 102. Dědeček, J., Sobalík, Z. & Wichterlová, B. Siting and Distribution of Framework Aluminium Atoms in Silicon-Rich Zeolites and Impact on Catalysis. *Catalysis Reviews - Science and Engineering* **54**, 135-223, doi:10.1080/01614940.2012.632662 (2012).
 103. Tukur, N. M. & Al-Khattaf, S. Comparison studies of xylene isomerization and disproportionation reactions between SSZ-33, TNU-9, mordenite and ZSM-5 zeolite catalysts. *Chemical Engineering Journal* **166**, 348-357, doi:10.1016/j.cej.2010.11.004 (2011).
 104. Saravanan, V., Waijers, D. A., Ziari, M. & Noordermeer, M. A. Recovery of 1-butanol from aqueous solutions using zeolite ZSM-5 with a high Si/Al ratio; suitability of a column process for industrial applications. *Biochemical Engineering Journal* **49**, 33-39, doi:10.1016/j.bej.2009.11.008 (2010).
 105. Ohlin, L., Bazin, P., Thibault-Starzyk, F., Hedlund, J. & Grahn, M. Adsorption of CO₂, CH₄, and H₂O in zeolite ZSM-5 studied using in situ ATR-FTIR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **117**, 16972-16982,

- doi:10.1021/jp4037183 (2013).
106. Lai, Z. *et al.* Microstructural optimization of a zeolite membrane for organic vapor separation. *Science* **300**, 456-460, doi:10.1126/science.1082169 (2003).
 107. Goda, S., Selyanchyn, R., Nozoe, T., Matsui, H. & Lee, S. W. Development of a Thin-Film Microextraction Device based on ZSM-5/Tenax TA for VOC Detection in Liquid Samples. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques* **2014**, S12, dx.doi.org/10.4172/2155-9872.S12-004.
 108. Kittur, A. A., Kariduraganavar, M. Y., Kulkarni, S. S. & Aralaguppi, M. I. Preparation of zeolite-incorporated poly(dimethyl siloxane) membranes for the pervaporation separation of isopropyl alcohol/water mixtures. *Journal of Applied Polymer Science* **96**, 1377-1387, doi:10.1002/app.21566 (2005).
 109. Dotremont, C., Vankelecom, I. F. J., Morobé, M., Uytterhoeven, J. B. & Vandecasteele, C. Zeolite-filled PDMS membranes. 2. Pervaporation of halogenated hydrocarbons. *Journal of Physical Chemistry B* **101**, 2160-2163 (1997).
 110. Rezakazemi, M., Shahidi, K. & Mohammadi, T. Hydrogen separation and purification using crosslinkable PDMS/zeolite A nanoparticles mixed matrix membranes. *International Journal of Hydrogen Energy* **37**, 14576-14589, doi:10.1016/j.ijhydene.2012.06.104 (2012).
 111. Chen, H., Zhang, H. & Yan, Y. Preparation and characterization of a novel gradient porous ZSM-5 zeolite membrane/PSSF composite and its application for toluene adsorption. *Chemical Engineering Journal* **209**, 372-378, doi:10.1016/j.cej.2012.08.020 (2012).
 112. Ramaiah, K. P., Satyasri, D., Sridhar, S. & Krishnaiah, A. Removal of hazardous chlorinated VOCs from aqueous solutions using novel ZSM-5 loaded PDMS/PVDF composite membrane consisting of three hydrophobic layers. *Journal of Hazardous Materials* **261**, 362-371, doi:10.1016/j.jhazmat.2013.07.048 (2013).
 113. Gu, J. *et al.* ZSM-5 filled polyether block amide membranes for separating EA from aqueous solution by pervaporation. *International Journal of Polymer Science* **2013**, doi:10.1155/2013/760156 (2013).
 114. Hawley, H. A., Bergendahl, J. & Thompson, R. An Equilibrium Study on Trichloroethylene Adsorption and Desorption from ZSM-5 in Water. *Energy and Environmental Engineering* **1**, 5-9. doi: 10.13189/eee.2013.010102 (2013).
 115. Zhao, S., Cao, X. C., Ma, Z. J., Wang, Z., Qiao, Z. H., Wang, J. X. & Wang, S. C. Mixed-matrix membranes for CO₂/N₂ separation comprising polyvinylamine matrix and metal-organic frameworks. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **54**, 5139-5148. doi: 10.1021/ie504786x (2015).

116. Rezakazemi, M., Shahidi, K. & Mohammadi, T. Sorption properties of hydrogen-selective PDMS/zeolite 4A mixed matrix membrane. *International Journal of Hydrogen Energy* **37**, 17275-17284, doi:10.1016/j.ijhydene.2012.08.109 (2012).

第 2 章

1. Kamila, S. *et al.* Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers*, doi.org/10.1155/2015/981458 (2015).
2. Filipiak, W. *et al.* Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. *Journal of Breath Research* **8**, doi:10.1088/1752-7155/8/2/027111 (2014).
3. Hakim, M. *et al.* Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews* **112**, 5949-5966, doi:10.1021/cr300174a (2012).
4. Barash, O. *et al.* Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics. *Oncotarget* **6**, 44864-44876, doi:10.18632/oncotarget.6269 (2015).
5. Amann, A., Schmid, A., Scholl-Bürgi, S., Telser, S. & Hinterhuber, H. Breath analysis for medical diagnosis and therapeutic monitoring. *Spectroscopy Europe* **17**, 18-20 (2005).
6. Louch, D., Motlagh, S. & Pawliszyn, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* **64**, 1187-1199 (1992).
7. Ali, I., Kulsum, U., Alothman, Z. A., Alwarthan, A. A. & Saleem, K. Advances in analyses of profens in biological and environmental samples by liquid chromatography. *Current Pharmaceutical Analysis* **12**, 158-176, doi:10.2174/1573412912999151120155536 (2016).
8. Ali, I., Gupta, V. K., Aboul-Enein, H. Y. & Hussain, A. Hyphenation in sample preparation: Advancement from the micro to the nano world. *Journal of Separation Science* **31**, 2040-2053, doi:10.1002/jssc.200800123 (2008).
9. I. Ali, Nano-Hyphenation Technologies, LabPlus International, April/May Issue (2009) 14-16.
10. Zaarour, M., Dong, B., Naydenova, I., Retoux, R. & Mintova, S. Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications. *Microporous and Mesoporous Materials* **189**, 11-21, doi:10.1016/j.micromeso.2013.08.014 (2014).
11. Tian, J. *et al.* Application of nanomaterials in sample preparation. *Journal of Chromatography A* **1300**, 2-16, doi:10.1016/j.chroma.2013.04.010 (2013).
12. Jiang, R. & Pawliszyn, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-

- phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **39**, 245-253, doi:10.1016/j.trac.2012.07.005 (2012).
13. Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M. & Pawliszyn, J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Analytica Chimica Acta* **856**, 35-45, doi:10.1016/j.aca.2014.11.029 (2015).
 14. Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T. & Pawliszyn, J. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* **804**, 111-119, doi:10.1016/j.aca.2013.09.056 (2013).
 15. Ali, I., Kulsum, U., Al-Othman, Z. A., Alwarthan, A. & Saleem, K. Functionalized nanoparticles based solid-phase membrane micro-tip extraction and high-performance liquid chromatography analyses of vitamin B complex in human plasma. *Journal of Separation Science* **39**, 2678-2688, doi:10.1002/jssc.201600194 (2016).
 16. Hussain, A., Alajmi, M. F. & Ali, I. Determination of chloramphenicol in biological matrices by solid-phase membrane micro-tip extraction and capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography* **30**, 1935-1941, doi:10.1002/bmc.3769 (2016).
 17. Ali, I., Rani, D. & Al-Othman, Z. A. Analysis of ibuprofen, pantoprazole, and itopride combination therapeutic drugs in human plasma by solid phase membrane microtip extraction and high-performance liquid chromatography methods using new generation core shell C₁₈ column. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **39**, 339-345, doi:10.1080/10826076.2016.1152583 (2016).
 18. Zheng, J. *et al.* Monodisperse microporous carbon nanospheres: An efficient and stable solid phase microextraction coating material. *Analytica Chimica Acta* **884**, 44-51, doi:10.1016/j.aca.2015.05.017 (2015).
 19. Zhu, F. *et al.* Preparation and characterization of porous carbon material-coated solid-phase microextraction metal fibers. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7848-7854, doi:10.1016/j.chroma.2010.10.080 (2010).
 20. Kokotailo, G. T., Lawton, S. L., Olson, D. H. & Meier, W. M. Structure of synthetic zeolite ZSM-5. *Nature* **272**, 437-438, doi:10.1038/272437a0 (1978).
 21. Dědeček, J., Sobalík, Z. & Wichterlová, B. Siting and Distribution of Framework Aluminium Atoms in Silicon-Rich Zeolites and Impact on Catalysis. *Catalysis Reviews - Science and Engineering* **54**, 135-223, doi:10.1080/01614940.2012.632662 (2012).
 22. Saravanan, V., Waijers, D. A., Ziari, M. & Noordermeer, M. A. Recovery of 1-butanol from aqueous solutions using zeolite ZSM-5 with a high Si/Al ratio; suitability of a column process for industrial applications. *Biochemical Engineering Journal* **49**, 33-

- 39, doi:10.1016/j.bej.2009.11.008 (2010).
23. Saravanan, V., Wijers, D. A., Ziari, M. & Noordermeer, M. A. Recovery of 1-butanol from aqueous solutions using zeolite ZSM-5 with a high Si/Al ratio; suitability of a column process for industrial applications. *Biochemical Engineering Journal* **49**, 33-39, doi:10.1016/j.bej.2009.11.008 (2010).
 24. Ohlin, L., Bazin, P., Thibault-Starzyk, F., Hedlund, J. & Grahn, M. Adsorption of CO₂, CH₄, and H₂O in zeolite ZSM-5 studied using in situ ATR-FTIR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C* **117**, 16972-16982, doi:10.1021/jp4037183 (2013).
 25. Lai, Z. *et al.* Microstructural optimization of a zeolite membrane for organic vapor separation. *Science* **300**, 456-460, doi:10.1126/science.1082169 (2003).
 26. Ramaiah, K. P., Satyasri, D., Sridhar, S. & Krishnaiah, A. Removal of hazardous chlorinated VOCs from aqueous solutions using novel ZSM-5 loaded PDMS/PVDF composite membrane consisting of three hydrophobic layers. *Journal of Hazardous Materials* **261**, 362-371, doi:10.1016/j.jhazmat.2013.07.048 (2013).
 27. Hawley, H. A. An Equilibrium Study on Trichloroethylene Adsorption and Desorption from ZSM-5 in Water. *Energy and Environmental Engineering* **1**, 5-9, doi: 10.13189/eee.2013.010102 (2013).
 28. Chen, H., Zhang, H. & Yan, Y. Preparation and characterization of a novel gradient porous ZSM-5 zeolite membrane/PSSF composite and its application for toluene adsorption. *Chemical Engineering Journal* **209**, 372-378, doi:10.1016/j.cej.2012.08.020 (2012).
 29. S. Goda, R. Selyanchyn, T. Nozoe, H. Matsui, S.W. Lee, Development of a Thin-Film Microextraction Device based on ZSM-5/Tenax TA for VOC Detection in Liquid Samples, *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques* **S12**, doi: 10.4172/2155-9872.S12-004 (2014).
 30. Friedel, R. A., Shultz, J. L. & Sharkey Jr, A. G. Mass spectra of alcohols, *Analytical Chemistry* **28**, 926-934, doi:10.1021/ac60114a002 (1956).
 31. H.G. Jang, H.K. Min, J.K. Lee, S.B. Hong, G. Seo, SAPO-34 and ZSM-5 nanocrystals size effects on their catalysis of methanol-to-olefin reactions, *Applied Catalysis A: General*, 437-438 (2012) 120-130.
 32. Hanai, Y. *et al.* Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **76**, 679-684, doi:10.1271/bbb.110760 (2012).
 33. Filipiak, W. *et al.* TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells in vitro. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **19**, 182-195, doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0162 (2010).

34. Kwak, J. *et al.* Volatile biomarkers from human melanoma cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **931**, 90-96, doi:10.1016/j.jchromb.2013.05.007 (2013).
35. Capuano, R. *et al.* The lung cancer breath signature: A comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lungs. *Scientific Reports* **5**, doi:10.1038/srep16491 (2015).
36. Liu, H. *et al.* Characterization of Volatile Organic Metabolites in Lung Cancer Pleural Effusions by SPME–GC/MS Combined with an Untargeted Metabolomic Method. *Chromatographia* **77**, 1379-1386, doi:10.1007/s10337-014-2720-y (2014).
37. Peled, N. *et al.* Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules. *Journal of Thoracic Oncology* **7**, 1528-1533, doi:10.1097/JTO.0b013e3182637d5f (2012).
38. Mochalski, P. *et al.* Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. *Cancer Cell International* **13**, doi:10.1186/1475-2867-13-72 (2013).
39. Acevedo, C. A., Sanchez, E. Y., Reyes, J. G. & Young, M. E. Volatile profiles of human skin cell cultures in different degrees of senescence. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**, 449-455, doi:10.1016/j.jchromb.2009.12.033 (2010).
40. Hanai, Y. *et al.* Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell International* **12**, doi:10.1186/1475-2867-12-7 (2012).
41. Wang, C. *et al.* Volatile organic metabolites identify patients with breast cancer, cyclomastopathy, and mammary gland fibroma. *Scientific Reports* **4**, doi:10.1038/srep05383 (2014).
42. Schallschmidt, K. *et al.* Investigation of cell culture volatilomes using solid phase micro extraction: Options and pitfalls exemplified with adenocarcinoma cell lines. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1006**, 158-166, doi:10.1016/j.jchromb.2015.10.004 (2015).
43. Silva, C. L., Passos, M. & Câmara, J. S. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers - A powerful strategy for breast cancer diagnosis. *Talanta* **89**, 360-368, doi:10.1016/j.talanta.2011.12.041 (2012).
44. Huang, Y., Li, Y., Luo, Z. & Duan, Y. Investigation of biomarkers for discriminating breast cancer cell lines from normal mammary cell lines based on VOCs analysis and metabolomics. *RSC Advances* **6**, 41816-41824, doi:10.1039/c6ra03238a (2016).
45. Nozoe, T. *et al.* In vitro detection of small molecule metabolites excreted from cancer

- cells using a Tenax TA thin-film microextraction device. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **991**, 99-107, doi:10.1016/j.jchromb.2015.04.016 (2015).
46. Peralbo-Molina, A., Calderón-Santiago, M., Priego-Capote, F., Jurado-Gámez, B. & Luque De Castro, M. D. Identification of metabolomics panels for potential lung cancer screening by analysis of exhaled breath condensate. *Journal of Breath Research* **10**, doi:10.1088/1752-7155/10/2/026002 (2016).
 47. Ren, J. *et al.* Simultaneous quantification of serum nonesterified and esterified fatty acids as potential biomarkers to differentiate benign lung diseases from lung cancer. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep34201 (2016).
 48. Miyamoto, S. Systemic Metabolomic Changes in Blood Samples of Lung Cancer Patients Identified by Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Metabolites* **9**, 192-210, doi: 10.3390/metabo5020192 (2015).
 49. Chen, J. L. *et al.* Metabolomics of gastric cancer metastasis detected by gas chromatography and mass spectrometry. *World Journal of Gastroenterology* **16**, 5874-5880, doi:10.3748/wjg.v16.i46.5874 (2010).
 50. Saadatian-Elahi, M., Norat, T., Goudable, J. & Riboli, E. Biomarkers of dietary fatty acid intake and the risk of breast cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer* **111**, 584-591, doi:10.1002/ijc.20284 (2004).
 51. Chatterjee, S., Castro, M. & Feller, J. F. An e-nose made of carbon nanotube based quantum resistive sensors for the detection of eighteen polar/nonpolar VOC biomarkers of lung cancer. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 4563-4575, doi:10.1039/c3tb20819b (2013).
 52. Phillips, M. *et al.* Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* **87**, 44-52, doi:10.1016/j.tube.2006.03.004 (2007).
 53. Phillips, M. *et al.* Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* **90**, 145-151, doi:10.1016/j.tube.2010.01.003 (2010).
 54. Feng, S. *et al.* Analysis of serum metabolic profile by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry for biomarkers discovery: Application in a pilot study to discriminate patients with tuberculosis. *Chinese Medical Journal* **128**, 159-168, doi:10.4103/0366-6999.149188 (2015).
 55. Ahmed, I., Greenwood, R., de Costello, B. L., Ratcliffe, N. M. & Probert, C. S. An Investigation of Fecal Volatile Organic Metabolites in Irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE* **8**, doi:10.1371/journal.pone.0058204 (2013).
 56. Zou, Y. *et al.* Optimization of volatile markers of lung cancer to exclude interferences of non-malignant disease. *Cancer Biomarkers* **14**, 371-379, doi:10.3233/CBM-

140418 (2014).

57. Chen, X. *et al.* A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer* **110**, 835-844, doi:10.1002/cncr.22844 (2007).
58. Schallschmidt, K. *et al.* Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls - Challenges and limitations of an observational study. *Journal of Breath Research* **10**, doi:10.1088/1752-7155/10/4/046007 (2016).
59. Liu, H. *et al.* Quantitative analysis of volatile biomarkers in breath of non-small cell lung cancer patients. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment* **16**, 1857-1859 (2009).

第 3 章

1. Holmes, E., Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* **134**, 714-717, doi:10.1016/j.cell.2008.08.026 (2008).
2. Griffin, J. L. & Shockcor, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **4**, 551-561 (2004).
3. Kusuhara, M., Urakami, K., Zangiacomi, V. & Hoshino, K. Disease and Smell: "Byoshu". *Anti-Aging Medicine* **7**, 66-72, (2010).
4. Schmidt, K. & Podmore, I. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers* **2015**, Article ID 981458, doi.org/10.1155/2015/98145, (2015.).
5. Hakim, M. *et al.* Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews* **112**, 5949-5966, doi:10.1021/cr300174a (2012).
6. Wheelock, C. E. *et al.* Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal* **42**, 802-825, doi:10.1183/09031936.00078812 (2013).
7. Amann, A. *et al.* The human volatilome: Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *Journal of Breath Research* **8**, doi:10.1088/1752-7155/8/3/034001 (2014).
8. Peng, G. *et al.* Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **4**, 669-673, doi:10.1038/nnano.2009.235 (2009).
9. Wang, C. *et al.* Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. *Scientific Reports* **4**, doi:10.1038/srep07312 (2014).
10. Filipiak, W. *et al.* Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. *Journal of Breath Research* **8**, doi:10.1088/1752-7155/8/2/027111

- (2014).
11. Lavra, L. *et al.* Investigation of VOCs associated with different characteristics of breast cancer cells. *Scientific Reports* **5**, doi:10.1038/srep13246 (2015).
 12. Barash, O. *et al.* Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics. *Oncotarget* **6**, 44864-44876, doi:10.18632/oncotarget.6269 (2015).
 13. Peng, G. *et al.* Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *British Journal of Cancer* **103**, 542-551, doi:10.1038/sj.bjc.6605810 (2010).
 14. McCulloch, M. *et al.* Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integrative Cancer Therapies* **5**, 30-39, doi:10.1177/1534735405285096 (2006).
 15. Angle, T. C., Passler, T., Waggoner, P., Fischer, T. D. Rogers, B., Galik, P. K. & Maxwell, H. S. Real-time detection of a virus using detection dogs. *Frontiers in Veterinary Science* **2**, doi: 10.3389/fvets.2015.00079 (2015).
 16. Hirotsu, T. *et al.* A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS ONE* **10**, doi:10.1371/journal.pone.0118699 (2015).
 17. Louch, D., Motlagh, S. & Pawliszyn, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* **64**, 1187-1199 (1992).
 18. Zhang, Z. & Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **65**, 1843-1852 (1993).
 19. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* **902**, 167-194, doi:10.1016/S0021-9673(00)00934-1 (2000).
 20. Hanai, Y. *et al.* Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell International* **12**, doi:10.1186/1475-2867-12-7 (2012).
 21. Zhang, Y. *et al.* Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs. *Theranostics* **4**, 154-162, doi:10.7150/thno.7560 (2014).
 22. Qin, T. *et al.* The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **19**, 2247-2253, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0302 (2010).
 23. Lee, D. K. *et al.* Non-invasive characterization of the adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by HS-SPME/GC-MS. *Scientific Reports* **4**, doi:10.1038/srep06550 (2014).

24. Mochalski, P. *et al.* Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. *Cancer Cell International* **13**, doi:10.1186/1475-2867-13-72 (2013).
25. Reyes-Garcés, N., Bojko, B., Hein, D. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction Devices Prepared on Plastic Support as Potential Single-Use Samplers for Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry* **87**, 9722-9730, doi:10.1021/acs.analchem.5b01849 (2015).
26. Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M. & Pawliszyn, J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Analytica Chimica Acta* **856**, 35-45, doi:10.1016/j.aca.2014.11.029 (2015).
27. Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T. & Pawliszyn, J. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* **804**, 111-119, doi:10.1016/j.aca.2013.09.056 (2013).
28. Riazi Kermani, F. & Pawliszyn, J. Sorbent coated glass wool fabric as a thin film microextraction device. *Analytical Chemistry* **84**, 8990-8995, doi:10.1021/ac301861z (2012).
29. Bhatia, S., Abdullah, A. Z. & Wong, C. T. Adsorption of butyl acetate in air over silver-loaded Y and ZSM-5 zeolites: Experimental and modelling studies. *Journal of Hazardous Materials* **163**, 73-81, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.055 (2009).
30. Chen, H., Zhang, H. & Yan, Y. Preparation and characterization of a novel gradient porous ZSM-5 zeolite membrane/PSSF composite and its application for toluene adsorption. *Chemical Engineering Journal* **209**, 372-378, doi:10.1016/j.cej.2012.08.020 (2012).
31. Wong, R. P., Flematti, G. R. & Davis, T. M. Investigation of volatile organic biomarkers derived from *Plasmodium falciparum* in vitro. *Malaria Journal* **11**, doi:10.1186/1475-2875-11-314 (2012).
32. Jacobson, B. S. & Ryan, U. S. Growth of endothelial and HeLa cells on a new multipurpose microcarrier that is positive, negative or collagen coated. *Tissue and Cell* **14**, 69-83, doi:10.1016/0040-8166(82)90008-8 (1982).
33. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. & Gelber, C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *BioTechniques* **43**, 575-586, doi:10.2144/000112598 (2007).
34. Kwak, J. *et al.* Volatile biomarkers from human melanoma cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **931**, 90-96, doi:10.1016/j.jchromb.2013.05.007 (2013).

36. Chen, X. *et al.* A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer* **110**, 835-844, doi:10.1002/cncr.22844 (2007).
37. García, R. A., Morales, V., Martín, S., Vilches, E. & Toledano, A. Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering epidermoid laryngeal carcinomas. *Chromatographia* **77**, 501-509, doi:10.1007/s10337-013-2611-7 (2014).

第 4 章

38. Holmes, E., Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* **134**, 714-717, doi:10.1016/j.cell.2008.08.026 (2008).
39. Griffin, J. L. & Shockcor, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **4**, 551-561 (2004).
40. Kusuhara, M., Urakami, K., Zangiacomi, V. & Hoshino, K. Disease and Smell: “Byoshu”. *Anti-Aging Medicine* **7**, 66-72, (2010).
41. Schmidt, K. & Podmore, I. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers* **2015**, Article ID 981458, doi.org/10.1155/2015/98145, (2015.).
42. Hakim, M. *et al.* Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chemical Reviews* **112**, 5949-5966, doi:10.1021/cr300174a (2012).
43. Wheelock, C. E. *et al.* Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal* **42**, 802-825, doi:10.1183/09031936.00078812 (2013).
44. Amann, A. *et al.* The human volatilome: Volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *Journal of Breath Research* **8**, doi:10.1088/1752-7155/8/3/034001 (2014).
45. Peng, G. *et al.* Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **4**, 669-673, doi:10.1038/nnano.2009.235 (2009).
46. Wang, C. *et al.* Exhaled volatile organic compounds as lung cancer biomarkers during one-lung ventilation. *Scientific Reports* **4**, doi:10.1038/srep07312 (2014).
47. Filipiak, W. *et al.* Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers. *Journal of Breath Research* **8**, doi:10.1088/1752-7155/8/2/027111 (2014).
48. Lavra, L. *et al.* Investigation of VOCs associated with different characteristics of breast cancer cells. *Scientific Reports* **5**, doi:10.1038/srep13246 (2015).

49. Barash, O. *et al.* Differentiation between genetic mutations of breast cancer by breath volatolomics. *Oncotarget* **6**, 44864-44876, doi:10.18632/oncotarget.6269 (2015).
50. Peng, G. *et al.* Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *British Journal of Cancer* **103**, 542-551, doi:10.1038/sj.bjc.6605810 (2010).
51. McCulloch, M. *et al.* Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integrative Cancer Therapies* **5**, 30-39, doi:10.1177/1534735405285096 (2006).
52. Angle, T. C., Passler, T., Waggoner, P., Fischer, T. D. Rogers, B., Galik, P. K. & Maxwell, H. S. Real-time detection of a virus using detection dogs. *Frontiers in Veterinary Science* **2**, doi: 10.3389/fvets.2015.00079 (2015).
53. Hirotsu, T. *et al.* A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS ONE* **10**, doi:10.1371/journal.pone.0118699 (2015).
54. Louch, D., Motlagh, S. & Pawliszyn, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* **64**, 1187-1199 (1992).
55. Zhang, Z. & Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **65**, 1843-1852 (1993).
56. Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A* **902**, 167-194, doi:10.1016/S0021-9673(00)00934-1 (2000).
57. Hanai, Y. *et al.* Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell International* **12**, doi:10.1186/1475-2867-12-7 (2012).
58. Zhang, Y. *et al.* Identification of volatile biomarkers of gastric cancer cells and ultrasensitive electrochemical detection based on sensing interface of Au-Ag alloy coated MWCNTs. *Theranostics* **4**, 154-162, doi:10.7150/thno.7560 (2014).
59. Qin, T. *et al.* The screening of volatile markers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **19**, 2247-2253, doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0302 (2010).
60. Lee, D. K. *et al.* Non-invasive characterization of the adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by HS-SPME/GC-MS. *Scientific Reports* **4**, doi:10.1038/srep06550 (2014).
61. Mochalski, P. *et al.* Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. *Cancer Cell International* **13**, doi:10.1186/1475-2867-13-72 (2013).

63. Reyes-Garcés, N., Bojko, B., Hein, D. & Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction Devices Prepared on Plastic Support as Potential Single-Use Samplers for Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry* **87**, 9722-9730, doi:10.1021/acs.analchem.5b01849 (2015).
64. Bessonneau, V., Boyaci, E., Maciazek-Jurczyk, M. & Pawliszyn, J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Analytica Chimica Acta* **856**, 35-45, doi:10.1016/j.aca.2014.11.029 (2015).
65. Jiang, R., Cudjoe, E., Bojko, B., Abaffy, T. & Pawliszyn, J. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Analytica Chimica Acta* **804**, 111-119, doi:10.1016/j.aca.2013.09.056 (2013).
66. Riazi Kermani, F. & Pawliszyn, J. Sorbent coated glass wool fabric as a thin film microextraction device. *Analytical Chemistry* **84**, 8990-8995, doi:10.1021/ac301861z (2012).
67. Bhatia, S., Abdullah, A. Z. & Wong, C. T. Adsorption of butyl acetate in air over silver-loaded Y and ZSM-5 zeolites: Experimental and modelling studies. *Journal of Hazardous Materials* **163**, 73-81, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.055 (2009).
68. Chen, H., Zhang, H. & Yan, Y. Preparation and characterization of a novel gradient porous ZSM-5 zeolite membrane/PSSF composite and its application for toluene adsorption. *Chemical Engineering Journal* **209**, 372-378, doi:10.1016/j.cej.2012.08.020 (2012).
69. Wong, R. P., Flematti, G. R. & Davis, T. M. Investigation of volatile organic biomarkers derived from *Plasmodium falciparum* in vitro. *Malaria Journal* **11**, doi:10.1186/1475-2875-11-314 (2012).
70. Jacobson, B. S. & Ryan, U. S. Growth of endothelial and HeLa cells on a new multipurpose microcarrier that is positive, negative or collagen coated. *Tissue and Cell* **14**, 69-83, doi:10.1016/0040-8166(82)90008-8 (1982).
71. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. & Gelber, C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *BioTechniques* **43**, 575-586, doi:10.2144/000112598 (2007).
72. Kwak, J. *et al.* Volatile biomarkers from human melanoma cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **931**, 90-96, doi:10.1016/j.jchromb.2013.05.007 (2013).
73. Chen, X. *et al.* A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis. *Cancer* **110**, 835-844, doi:10.1002/cncr.22844 (2007).

74. García, R. A., Morales, V., Martín, S., Vilches, E. & Toledano, A. Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering epidermoid laryngeal carcinomas. *Chromatographia* **77**, 501-509, doi:10.1007/s10337-013-2611-7 (2014).

第 5 章

第 1 節

1. Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G. & Colonna, G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* **518**, 335-345, doi:10.1016/j.gene.2012.12.106 (2013).
2. Chen, L., Yang, X., Jiao, H. & Zhao, B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicological Sciences* **69**, 149-156, doi:10.1093/toxsci/69.1.149 (2002).
3. Murakami, C., Hirakawa, Y., Inui, H., Nakano, Y. & Yoshida, H. Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **48**, 89-94 (2002).
4. Narayanan, V. S., Fitch, C. A. & Levenson, C. W. Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human Hep G2 cells. *Journal of Nutrition* **131**, 1427-1432 (2001).
5. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]. *Nature* **282**, 615-616, doi:10.1038/282615a0 (1979).
6. B1 Xia, J. *et al.* Preliminary investigation of five novel long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *BioScience Trends* **10**, 315-319, doi:10.5582/bst.2016.01140 (2016).
7. B2 Di Masi, A. *et al.* Characterization of HUH6, HEP3B, HEPG2 and HLE liver cancer cell lines by WNT/Q- catenin pathway, microrna expression and protein expression profile. *Cellular and Molecular Biology* **56**, doi:10.1170/149 (2010).
8. B3 Mochalski, P. *et al.* Release and uptake of volatile organic compounds by human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) in vitro. *Cancer Cell International* **13**, doi:10.1186/1475-2867-13-72 (2013).
9. B4 Nakagawa, T. *et al.* Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *Journal of Proteome Research* **11**, 2798-2806, doi:10.1021/pr201154k (2012).
10. B5 Halama, A., Riesen, N., Möller, G., Hrabě de Angelis, M. & Adamski, J. Identification of biomarkers for apoptosis in cancer cell lines using metabolomics:

Tools for individualized medicine. *Journal of Internal Medicine* **274**, 425-439, doi:10.1111/joim.12117 (2013).

11. Sponring, A. *et al.* Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in the headspace of NCI-H1666 lung cancer cells. *Cancer Biomarkers* **7**, 153-161, doi:10.3233/CBM-2010-0182 (2010).
12. Filipiak, W. *et al.* Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell International* **8**, doi:10.1186/1475-2867-8-17 (2008).

第 2 節

1. Monks, A. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**, 757-766, doi:10.1093/jnci/83.11.757 (1991).
2. Pyo, J. S., Ju, H. K., Park, J. H. & Kwon, S. W. Determination of volatile biomarkers for apoptosis and necrosis by solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry: A pharmacometabolomic approach to cisplatin's cytotoxicity to human lung cancer cell lines. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **876**, 170-174, doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.031 (2008).
3. Ratner, S., Weissman, N. & Schoenheimer R. The metabolism of d-lysine investigated with deuterium and heavy nitrogen.
4. Ambade, A., Satishchandran, A. & Szabo, G. Alcoholic hepatitis accelerates early hepatobiliary cancer by increasing stemness and MIR-122-mediated HIF-1 α activation. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep21340 (2016).
5. Shulga, N. & Pastorino, J. G. Mitoneet mediates TNF α -induced necroptosis promoted by exposure to fructose and ethanol. *Journal of Cell Science* **127**, 896-907, doi:10.1242/jcs.140764 (2014).

第 3 節

1. Nie, F. *et al.* Reactive oxygen species accumulation contributes to gambogic acid-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Toxicology* **260**, 60-67, doi:10.1016/j.tox.2009.03.010 (2009).
2. Qiang, L. *et al.* Inhibition of glioblastoma growth and angiogenesis by gambogic acid: An in vitro and in vivo study. *Biochemical Pharmacology* **75**, 1083-1092, doi:10.1016/j.bcp.2007.10.033 (2008).
3. Yi, T. *et al.* Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling. *Cancer Research* **68**, 1843-1850, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5944 (2008).

4. Wang, C., Zhang, H., Chen, Y., Shi, F. & Chen, B. Gambogic acid-loaded magnetic Fe₃O₄ nanoparticles inhibit Panc-1 pancreatic cancer cell proliferation and migration by inactivating transcription factor ETS1. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 781-787, doi:10.2147/IJN.S28509 (2012).
5. Yue, Q. *et al.* Proteomic analysis revealed the important role of vimentin in human cervical carcinoma HeLa cells treated with gambogic acid. *Molecular and Cellular Proteomics* **15**, 26-44, doi:10.1074/mcp.M115.053272 (2016).
6. Wen, C. *et al.* Gambogic acid inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology* **47**, 1663-1671, doi:10.3892/ijo.2015.3166 (2015).
7. Yang, Y. *et al.* Gambogic acid enhances the radiosensitivity of human esophageal cancer cells by inducing reactive oxygen species via targeting Akt/mTOR pathway. *Tumor Biology* **37**, 1853-1862, doi:10.1007/s13277-015-3974-1 (2016).
8. Ma, J. *et al.* Gambogic acid inhibits osteoclast formation and ovariectomy-induced osteoporosis by suppressing the JNK, p38 and Akt signalling pathways. *Biochemical Journal* **469**, 399-408, doi:10.1042/BJ20150151 (2015).
9. Yang, L. J. & Chen, Y. New targets for the antitumor activity of gambogic acid in hematologic malignancies. *Acta Pharmacologica Sinica* **34**, 191-198, doi:10.1038/aps.2012.163 (2013).
10. Prasad, S., Pandey, M. K., Yadav, V. R. & Aggarwal, B. B. Gambogic acid inhibits STAT3 phosphorylation through activation of protein tyrosine phosphatase SHP-1: Potential role in proliferation and apoptosis. *Cancer Prevention Research* **4**, 1084-1094, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0340 (2011).

第 6 章

1. Jellum, E., Stokke, O. & Eldjarn, L. Application of gas chromatography, mass spectrometry, and computer methods in clinical biochemistry. *Analytical Chemistry* **45**, 1099-1106 (1973).
2. Feinberg, T. *et al.* Cancerous glucose metabolism in lung cancer - Evidence from exhaled breath analysis. *Journal of Breath Research* **10**, doi:10.1088/1752-7155/10/2/026012 (2016).
3. Chen, J. *et al.* Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Analytica Chimica Acta* **678**, 44-49, doi:10.1016/j.aca.2010.08.008 (2010).
4. Sugimoto, M., Wong, D. T., Hirayama, A., Soga, T. & Tomita, M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast

- and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* **6**, 78-95, doi:10.1007/s11306-009-0178-y (2010).
5. 臭覚と匂い・香りの産業利用最前線、NTS、2013.
 6. Maddocks, O. D. K. *et al.* Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* **493**, 542-546, doi:10.1038/nature11743 (2013).
 7. Peng, G. *et al.* Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **4**, 669-673, doi:10.1038/nnano.2009.235 (2009).]
 8. James, S. W. & Tatam, R. P. Optical fibre long-period grating sensors: Characteristics and application. *Measurement Science and Technology* **14**, doi:10.1088/0957-0233/14/5/201 (2003).
 9. Timmer, B., Olthuis, W. & Van Den Berg, A. Ammonia sensors and their applications -A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **107**, 666-677, doi:10.1016/j.snb.2004.11.054 (2005).
 10. S. Budarvari, et al., The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th ed., Merck, 1996.
 11. Radhakrishnan, H., Gopi, M. & Arumugam, A. Ammonium dichromate poisoning: A rare cause of acute kidney injury. *Indian Journal of Nephrology* **24**, 380-381, doi:10.4103/0971-4065.133781 (2014).
 12. Turner, C., Španěl, P. & Smith, D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS. *Physiological Measurement* **27**, 321-337, doi:10.1088/0967-3334/27/4/001 (2006).
 13. Samejima, K. Regulation of polyamine and cancer. *Yakugaku Zasshi* **126**, 529-542, doi:10.1248/yakushi.126.529 (2006).
 14. Russell, D. H., Levy, C. C., Schimpft, S. C. & Hawk, I. A. Urinary Polyamines in Cancer Patients. *Cancer Research* **31**, 1555-1558 (1971).
 15. Russell, D. H. Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature New Biology* **233**, 144-145, doi:10.1038/newbio233144a0 (1971).
 16. Häkkinen, M. R. *et al.* Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45**, 625-634, doi:10.1016/j.jpba.2007.09.001 (2007).
 17. Magnes, C. *et al.* Polyamines in biological samples: Rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1331**, 44-51,

- doi:10.1016/j.chroma.2013.12.061 (2014).
18. Fletcher, J. T. & Bruck, B. S. Spermine detection via metal-mediated ethynylarene 'turn-on' fluorescence signaling. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 843-848, doi:10.1016/j.snb.2014.10.116 (2015).
 19. Ikeda, M. *et al.* [Zhong, L. D., Hai, Y. Z., Heng, X. Z. & Cheng, Z. H. Highly selective colorimetric detection of spermine in biosamples on basis of the non-crosslinking aggregation of ssDNA-capped gold nanoparticles. *Talanta* **106**, 255-260, doi:10.1016/j.talanta.2012.10.079 (2013). Montmorillonite-supramolecular hydrogel hybrid for fluorocolorimetric sensing of polyamines. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 1670-1673, doi:10.1021/ja109692z (2011).
 20. Jornet-Martínez, N., González-Béjar, M., Moliner-Martínez, Y., Campíns-Falcó, P. & Pérez-Prieto, J. Sensitive and selective plasmonic assay for spermine as biomarker in human urine. *Analytical Chemistry* **86**, 1347-1351, doi:10.1021/ac404165j (2014).
 21. Zhong, L. D., Hai, Y. Z., Heng, X. Z. & Cheng, Z. H. Highly selective colorimetric detection of spermine in biosamples on basis of the non-crosslinking aggregation of ssDNA-capped gold nanoparticles. *Talanta* **106**, 255-260, doi:10.1016/j.talanta.2012.10.079 (2013).
 22. Liang, X. *et al.* Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles. *Analyst* **136**, 179-183, doi:10.1039/c0an00432d (2011).
 23. James, S. W., Korposh, S., Lee, S. W. & Tatam, R. P. A long period grating-based chemical sensor insensitive to the influence of interfering parameters. *Optics Express* **22**, 8012-8023, doi:10.1364/OE.22.008012 (2014).
 24. Korposh, S. *et al.* Fiber optic long period grating sensors with a nanoassembled mesoporous film of SiO₂ nanoparticles. *Optics Express* **18**, 13227-13238, doi:10.1364/OE.18.013227 (2010).
 25. Del Villar, I. *et al.* Fringe generation with non-uniformly coated long-period fiber gratings. *Optics Express* **15**, 9326-9340, doi:10.1364/OE.15.009326 (2007).
 26. 小平 卓 北九州市立大学大学院国際環境工学部環境プロセス専攻 平成 20 年 修士論文. ポルフィリンの光学特性に基づいた光ファイバーセンサーの開発。
 27. Korposh, S. *et al.* Optical fibre long period grating with a nanoporous coating formed from silica nanoparticles for ammonia sensing in water. *Materials Chemistry and Physics* **133**, 784-792, doi:10.1016/j.matchemphys.2012.01.094 (2012).
 28. Korposh, S., Lee, S. W., James, S. W. & Tatam, R. P. Refractive index sensitivity of fibre-optic long period gratings coated with SiO₂ nanoparticle mesoporous thin films. *Measurement Science and Technology* **22**, doi:10.1088/0957-0233/22/7/075208

- (2011).
29. Selyanchyn, R., Wakamatsu, S., Hayashi, K. & Lee, S. W. A nano-thin film-based prototype QCM sensor array for monitoring human breath and respiratory patterns. *Sensors (Switzerland)* **15**, 18834-18850, doi:10.3390/s150818834 (2015).
 30. Li, X. et al. Highly conducting graphene sheets and Langmuir-Blodgett films. *Nature Nanotechnology* **3**, 538-542, doi:10.1038/nnano.2008.210 (2008).
 31. Zhang, S., Shao, Y., Yin, G. & Lin, Y. Carbon nanotubes decorated with Pt nanoparticles via electrostatic self-assembly: A highly active oxygen reduction electrocatalyst. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 2826-2830, doi:10.1039/b919494k (2010).
 32. Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials* **18**, 3203-3224, doi:10.1002/adma.200600113 (2006).
 33. Lu, Y. et al. Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol-gel dip-coating. *Nature* **389**, 364-368, doi:10.1038/38699 (1997).
 34. Carosio, F., Di Blasio, A., Alongi, J. & Malucelli, G. Layer by layer nanoarchitectures for the surface protection of polycarbonate. *European Polymer Journal* **49**, 397-404, doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.10.032 (2013).
 35. HH Rmaile.; Polyelectrolytes definition properties and applications. 2004.
 36. Zhou, M. *et al.* Stiffness tunable molecular spring washers: High-pressure raman investigations on porphyrin self-assemblies. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 1790-1793, doi:10.1021/jp910676y (2010).
 37. Fidler, H., Terpstra, J. & Wiersma, D. A. Dynamics of Frenkel excitons in disordered molecular aggregates. *The Journal of Chemical Physics* **94**, 6895-6907 (1991).
 38. Okada, S. & Segawa, H. Substituent-control exciton in J-aggregates of protonated water-insoluble porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 2792-2796, doi:10.1021/ja017768j (2003).
 39. 荒木和真 北九州市立大学国際環境工学研究科環境工学専攻修士論文 **2006**.
 40. 西出宏之 近藤雅雄, 1995). 東京化学同人 **1995**.
 41. Dunbar, A. *et al.* Understanding the interactions of porphyrin LB films with NO₂. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **284-285**, 339-344, doi:10.1016/j.colsurfa.2005.11.030 (2006).
 42. Rakow, N. A., Sen, A., Janzen, M. C., Ponder, J. B. & Suslick, K. S. Molecular recognition and discrimination of amines with a colorimetric array. *Angewandte Chemie - International Edition* **44**, 4528-4532, doi:10.1002/anie.200500939 (2005).
 43. Serhiy O. Korposh, N. T., Jeremy J. Ramsden, Seung-Woo Lee, and Toyoki Kunitake

- Journal of Biological Physics and Chemistry* **2006**, 6, 125-132.
44. Moriya, Y. *et al.* Analysis of Gibbs monolayer adsorbed at the toluene/water interface by UV-visible partial internal reflection spectrometry. *Analytical Chemistry* **78**, 7850-7856, doi:10.1021/ac061501r (2006).
 45. Decher, G.; Schlenoff, J. B., Lehn, J. Multilayer Thin Films-Sequential Assembly of Nanocomposite materials. Wiley-VCH, February 2003.
 46. Dubas, S. T. & Schlenoff, J. B. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules* **32**, 8153-8160, doi:10.1021/ma981927a (1999).
 47. Gittins, D. I. & Caruso, F. Tailoring the polyelectrolyte coating of metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 6846-6852, doi:10.1021/jp0111665 (2001).
 48. Kharlampieva, E. & Sukhishvili, S. A. Polyelectrolyte multilayers of weak polyacid and cationic copolymer: Competition of hydrogen-bonding and electrostatic interactions. *Macromolecules* **36**, 9950-9956, doi:10.1021/ma0350821 (2003).
 49. Dubas, S. T. & Schlenoff, J. B. Swelling and smoothing of polyelectrolyte multilayers by salt. *Langmuir* **17**, 7725-7727, doi:10.1021/la0112099 (2001).
 50. Maria, J. *et al.* Optimization of 3D plasmonic crystal structures for refractive index sensing. *Journal of Physical Chemistry C* **113**, 10493-10499, doi:10.1021/jp9024552 (2009).
 51. Vuillaume, P. Y., Glinel, K., Jonas, A. M. & Laschewsky, A. Ordered polyelectrolyte "multilayers". 6. Effect of molecular parameters on the formation of hybrid multilayers based on poly(diallylammonium) salts and exfoliated clay. *Chemistry of Materials* **15**, 3625-3631, doi:10.1021/cm021338q (2003).
 52. Bley, K., Sinatra, N., Vogel, N., Landfester, K. & Weiss, C. K. Switching light with light-advanced functional colloidal monolayers. *Nanoscale* **6**, 492-502, doi:10.1039/c3nr04897g (2014).
 53. Decher, G., Hong, J. D. & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **210-211**, 831-835, doi:10.1016/0040-6090(92)90417-A (1992).
 54. Kato, N., Schuetz, P., Fery, A. & Caruso, F. Thin multilayer films of weak polyelectrolytes on colloid particles. *Macromolecules* **35**, 9780-9787, doi:10.1021/ma0209388 (2002).
 55. Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277**, 1232-1237, doi:10.1126/science.277.5330.1232 (1997).
 56. Dai, J., Jensen, A. W., Mohanty, D. K., Erndt, J. & Bruening, M. L. Controlling the permeability of multilayered polyelectrolyte films through derivatization, cross-

- linking, and hydrolysis. *Langmuir* **17**, 931-937, doi:10.1021/la001363f (2001).
57. Lee, S. H., Kumar, J. & Tripathy, S. K. Thin film optical sensors employing polyelectrolyte assembly. *Langmuir* **16**, 10482-10489, doi:10.1021/la0011836 (2000).
 58. Optical fiber humidity sensor based on lossy mode resonances International journal on smart sensing and intelligent systems, Vol.2, No.4, 2009.
 59. Dai, J., Balachandra, A. M., Lee Li, J. & Bruening, M. L. Controlling ion transport through multilayer polyelectrolyte membranes by derivatization with photolabile functional groups. *Macromolecules* **35**, 3164-3170, doi:10.1021/ma011633g (2002).
 60. Chung, A. J. & Rubner, M. F. Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir* **18**, 1176-1183, doi:10.1021/la010873m (2002).
 61. Shi, X. & Caruso, F. Release behavior of thin-walled microcapsules composed of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **17**, 2036-2042, doi:10.1021/la001550d (2001).
 62. Sukhorukov, G. B., Antipov, A. A., Voigt, A., Donath, E. & Mhwald, H. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules. *Macromolecular Rapid Communications* **22**, 44-46, doi:10.1002/1521-3927(20010101)22:1<44::AID-MARC44>3.0.CO;2-U (2001).
 63. Dickey, F. H. The preparation of specific adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* **35**, 227-229 (1949).
 64. Tripathi, V. S., Kandimalla, V. B. & Ju, H. Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **114**, 1071-1082, doi:10.1016/j.snb.2005.07.037 (2006).
 65. Tatemichi, M., Sakamoto, M. A., Mizuhata, M., Deki, S. & Takeuchi, T. Protein-templated organic/inorganic hybrid materials prepared by liquid-phase deposition. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 10906-10910, doi:10.1021/ja071890m (2007).
 66. Wang, C., Li, C., Wei, L. & Wang, C. Electrochemical sensor for acetaminophen based on an imprinted TiO_2 thin film prepared by liquid phase deposition. *Microchimica Acta* **158**, 307-313, doi:10.1007/s00604-006-0728-1 (2007).
 67. Mizutani, N. *et al.* Remarkable enantioselectivity of molecularly imprinted TiO_2 nano-thin films. *Analytica Chimica Acta* **694**, 142-150, doi:10.1016/j.aca.2011.02.042 (2011).
 68. Lee, S. W., Ichinose, I. & Kunitake, T. Molecular imprinting of azobenzene carboxylic acid on a TiO_2 ultrathin film by the surface sol-gel process. *Langmuir* **14**, 2857-2863 (1998).

69. Takeuchi, T. & Hishiya, T. Molecular imprinting of proteins emerging as a tool for protein recognition. *Organic and Biomolecular Chemistry* **6**, 2459-2467, doi:10.1039/b715737c (2008).
70. Yu, J. G. *et al.* The Effect of Calcination Temperature on the Surface Microstructure and Photocatalytic Activity of TiO_2 Thin Films Prepared by Liquid Phase Deposition. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 13871-13879 (2003).
71. Tatemichi, M., Sakamoto, M. A., Mizuhata, M., Deki, S. & Takeuchi, T. Protein-templated organic/inorganic hybrid materials prepared by liquid-phase deposition. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 10906-10910, doi:10.1021/ja071890m (2007).
72. Feng, L., Liu, Y. & Hu, J. Molecularly imprinted TiO_2 thin film by liquid phase deposition for the determination of L-glutamic acid. *Langmuir* **20**, 1786-1790, doi:10.1021/la0357108 (2004).
73. Ghosh, S. K., Nath, S., Kundu, S., Esumi, K. & Pal, T. Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 13963-13971, doi:10.1021/jp047021q (2004).
74. Zhang, F. X. *et al.* Colorimetric detection of thiol-containing amino acids using gold nanoparticles. *Analyst* **127**, 462-465, doi:10.1039/b200007e (2002).
75. Li, Y., Wu, P., Xu, H., Zhang, H. & Zhong, X. Anti-aggregation of gold nanoparticle-based colorimetric sensor for glutathione with excellent selectivity and sensitivity. *Analyst* **136**, 196-200, doi:10.1039/c0an00452a (2011).
76. Liang, X. *et al.* Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles. *Analyst* **136**, 179-183, doi:10.1039/c0an00432d (2011).
77. Lin, J. H., Chang, C. W., Wu, Z. H. & Tseng, W. L. Colorimetric assay for S-adenosylhomocysteine hydrolase activity and inhibition using fluorosurfactant-capped gold nanoparticles. *Analytical Chemistry* **82**, 8775-8779, doi:10.1021/ac102020n (2010).
78. Liu, D. *et al.* Highly sensitive, colorimetric detection of mercury(II) in aqueous media by quaternary ammonium group-capped gold nanoparticles at room temperature. *Analytical Chemistry* **82**, 9606-9610, doi:10.1021/ac1021503 (2010).
79. Kalluri, J. R. *et al.* Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay: Selective detection of arsenic in groundwater. *Angewandte Chemie - International Edition* **48**, 9668-9671, doi:10.1002/anie.200903958 (2009).
80. S. S. R. Dasary, D. Senapati, A. K. Singh, Y. Anjaneyulu, H. Yu, P. C. Ray, *ACS Appl*

- Mater Interfaces.*, **2010**, 2, 3455.
81. Dasary, S. S. R., Singh, A. K., Senapati, D., Yu, H. & Ray, P. C. Gold nanoparticle based label-free SERS probe for ultrasensitive and selective detection of trinitrotoluene. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 13806-13812, doi:10.1021/ja905134d (2009).
 82. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **11**, 55-75, doi:10.1039/DF9511100055 (1951).
 83. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* **241**, 20-22, doi:10.1038/physci241020a0 (1974).
 84. Ivanov, M. R., Bednar, H. R. & Haes, A. J. Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electrophoresis. *ACS Nano* **3**, 386-394, doi:10.1021/nn8005619 (2009).
 85. Geall, A. J., Taylor, R. J., Earll, M. E., Eaton, M. A. W. & Blagbrough, I. S. Synthesis of cholesteryl polyamine carbamates: pK(a) studies and condensation of calf thymus DNA. *Bioconjugate Chemistry* **11**, 314-326, doi:10.1021/bc990115w (2000).
 86. Ikeda, M. *et al.* Montmorillonite-supramolecular hydrogel hybrid for fluorocolorimetric sensing of polyamines. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 1670-1673, doi:10.1021/ja109692z (2011).
 87. <http://www.sigmaaldrich.com/japan/materialscience/nanomaterials/goldnanoparticles.html>.
 88. Oishi, J. *et al.* Colorimetric enzymatic activity assay based on noncrosslinking aggregation of gold nanoparticles induced by adsorption of substrate peptides. *Biomacromolecules* **9**, 2301-2308, doi:10.1021/bm800192d (2008).
 89. Russell, D. H., Levy, C. C., Schimpff, S. C. & Hawk, I. A. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Research* **31**, 1555-1558 (1971).
 90. Wang, T. *et al.* A novel ammonia gas sensor using a nanoassembled polyelectrolyte thin film on fiber-optic long-period gratings. *Chemistry Letters* **41**, 1297-1299, doi:10.1246/cl.2012.1297 (2012).
 91. Wang, T., Korposh, S., James, S., Tatam, R. & Lee, S. W. Optical fiber long period grating sensor with a polyelectrolyte alternate thin film for gas sensing of amine odors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **185**, 117-124, doi:10.1016/j.snb.2013.04.034 (2013).
 92. Korposh, S., Wang, T., James, S., Tatam, R. & Lee, S. W. Pronounced aromatic

- carboxylic acid detection using a layer-by-layer mesoporous coating on optical fibre long period grating. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **173**, 300-309, doi:10.1016/j.snb.2012.07.005 (2012).
93. Korposh, S. *et al.* Optical fibre long period grating with a nanoporous coating formed from silica nanoparticles for ammonia sensing in water. *Materials Chemistry and Physics* **133**, 784-792, doi:10.1016/j.matchemphys.2012.01.094 (2012).
 94. Korposh, S. *et al.* Fiber optic long period grating sensors with a nanoassembled mesoporous film of SiO₂ nanoparticles. *Optics Express* **18**, 13227-13238, doi:10.1364/OE.18.013227 (2010).
 95. Isaacs, S. R., Choo, H., Ko, W. B. & Shon, Y. S. Chemical, thermal, and ultrasonic stability of hybrid nanoparticles and nanoparticle multilayer films. *Chemistry of Materials* **18**, 107-114, doi:10.1021/cm0518980 (2006).
 96. Bao, Y., Vigdeman, L., Zubarev, E. R. & Jiang, C. Robust multilayer thin films containing cationic thiol-functionalized gold nanorods for tunable plasmonic properties. *Langmuir* **28**, 923-930, doi:10.1021/la203993m (2012).
 97. Mani, V., Chikkaveeraiah, B. V., Patel, V., Gutkind, J. S. & Rusling, J. F. Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification. *ACS Nano* **3**, 585-594, doi:10.1021/nn800863w (2009).
 98. Peng, G. *et al.* Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **4**, 669-673, doi:10.1038/nnano.2009.235 (2009).
 99. Yonezawa, T., Onoue, S. Y. & Kunitake, T. Preparation of cationic gold nanoparticles and their monolayer formation on an anionic amphiphile layer. *Chemistry Letters*, 1061-1062 (1999).
 100. Yonezawa, T., Onoue, S. Y. & Kunitake, T. Formation of one-dimensional arrays of gold nanoparticles with DNA. *Kobunshi Ronbunshu* **56**, 855-859 (1999).